

Charakterisierung der biomechanischen Eigenschaften und extrazellulären Matrix bei BAV-assoziierten Aortopathien

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von: Clemens Cramer

geb. am 26.02.1993 in Berlin

angefertigt am: Sächsischen Inkubator für klinische Translation

Herzchirurgie, Universität Leipzig

Philipp-Rosenthal-Str. 55, 04103 Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. med. Christian D. Etz

Mitbetreuerin: Dr. med. Josephina Haunschild

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 28.01.2020

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Bikuspide Aortenklappe	1
1.1.1	Häufigkeit	1
1.1.2	Entstehung	1
1.1.3	Anatomie	3
1.1.4	Diagnose	4
1.1.5	Komplikationen	5
1.2	Proximale Aortopathie	6
1.2.1	Thorakales Aortenaneurysma	6
1.2.2	Aortendissektion	8
1.2.3	Therapie	10
1.3	Extrazelluläre Matrix und mechanische Eigenschaften der Aorta	12
1.3.1	Elastin	13
1.3.2	Kollagen	14
1.3.3	Glykosaminoglykane und Proteoglykane	14
2	Zielstellung	16
3	Material	17
3.1	Geräte	17
3.2	Verbrauchsmaterialien	19
3.3	Chemikalien	20
3.4	Antikörper	23
3.4.1	Primärantikörper	23
3.4.2	Sekundärantikörper	23
3.5	Software	23
4	Methoden	25
4.1	Patientenpopulation	25

4.2	Präparation der Aorta	25
4.3	Biomechanisches Stretching	26
4.4	Auswertung des Stretchings	28
4.5	Hyaluronsäure-Assay	29
4.6	Glykosaminoglykan-Assay.....	31
4.7	Elastin-Assay	32
4.8	Kollagen-Assay.....	33
4.9	Proteinextraktion.....	34
4.10	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	34
4.11	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese.....	35
4.12	Western Blot	36
4.13	Immundetektion	37
4.14	Einbetten in Paraffin	37
4.15	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	38
4.16	Alcianblau-PAS-Färbung	39
4.17	Von-Kossa-Färbung.....	40
4.18	Auswertung der Färbungen	41
4.18.1	HE-Färbung.....	41
4.18.2	Alcianblau-PAS-Färbung	41
4.18.3	Von-Kossa-Färbung	44
4.19	Statistik	44
5	Ergebnisse	45
5.1	Biomechanisches Stretching und zugehörige EZM-Bestandteile.....	45
5.1.1	Einteilung nach Elastizitätsmodul	49
5.1.2	Einteilung nach Aortendurchmesser.....	53
5.1.3	Exemplarische Histologie des untersuchten Aortengewebes	59
5.2	Quantifizierung der Bestandteile der Aortenwand	62

5.2.1	Wanddicke der Aorta	64
5.2.2	Hyaluronsäure	67
5.2.3	GAG	68
5.2.4	Verteilung und Clusterbildung der Hyaluronsäure	69
5.2.5	Biglycan	70
5.2.6	Elastin	72
5.2.7	Kollagen	73
5.2.8	Kalzifizierung	74
6	Diskussion	76
6.1	Diskussion des biomechanischen Stretchings	77
6.1.1	Untersuchung anhand des Elastizitätsmoduls	77
6.1.2	Untersuchung anhand des Aortendurchmessers	85
6.2	Diskussion der Bestandteile der Aortenwand	89
6.2.1	Untersuchung von Elastin und Kollagen	90
6.2.2	Untersuchung der Hyaluronsäure, GAG und Biglycan	91
6.2.3	Untersuchung von Wanddicke und Kalzifizierung	93
6.3	Schlussfolgerung	96
6.4	Limitationen	97
7	Zusammenfassung der Arbeit	99
8	Literaturverzeichnis	104
9	Abbildungsverzeichnis	123
10	Tabellenverzeichnis	125
	Danksagung	127
	Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	128
	Lebenslauf	129

Abkürzungsverzeichnis

A	Abdominal
A	Querschnittsfläche
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
ACC	<i>engl. American College of Cardiology</i>
AGE	<i>engl. advanced glycation endproducts</i>
AHA	<i>engl. American Heart Association</i>
aHT	arterielle Hypertonie
AK	Antikörper
ANOVA	<i>engl. analysis of variance</i>
Aorta asc.	<i>Aorta ascendens</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>
BAV	<i>engl. bicuspid aortic valve</i>
BCA	<i>engl. bichinchoninic acid</i>
Bis	Bisacrylamid
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
cm	Zentimeter
CPC	Cetylpyridiniumchlorid
D	<i>Dorsal</i>
DMAB	Dimethylaminobenzaldehyd
CT	Computertomographie
E	Elastizitätsmodul
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESC	<i>engl. European Society of Cardiology</i>
et al.	<i>Et alii</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
e.V.	Eingetragener Verein
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)

g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykane
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HCl	Chlorwasserstoffsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
IgG	Immunglobulin G
IOM	Institut für Oberflächenmodifizierung
K	konkav
kDa	Kilodalton
KHK	koronare Herzkrankheit
l	Liter
L-R	Links-rechts-koronar
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
M	molar (mol pro Liter)
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minuten
mm	Millimeter
MPa	Mega-Pascal
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl
N	Newton
N-L	Non-koronar-links
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
Nr.	Nummer
OP	Operation
PAS	<i>engl. Periodic acid-Schiff reaction</i>
PBS	<i>engl. Phosphate-buffered saline</i>

PG	Proteoglykan
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
PVDF	Polyvinylidenflourid
p-Wert	Signifikanzwert
R-N	Rechts-non-koronar
RIPA	<i>engl. radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	<i>engl. ribonucleic acid</i>
s	Sekunde
s.	siehe
SDS	<i>engl. sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sELAF	<i>engl. soluble elastin fragments</i>
SEM	<i>engl. standard error of the mean</i>
Tab.	Tabelle
TAV	<i>engl. tricuspid aortic valve</i>
TBS	<i>engl. Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>engl. Tris-buffered saline with Tween®20</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TPPS	Tetraphenylporphintetrasulfonat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTE	transthorakale Echokardiographie
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolettstrahlung
ÜN	Über Nacht
V	konvex
vgl.	Vergleiche
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
4D	vierdimensional

1 Einleitung

1.1 Bikuspidale Aortenklappe

1.1.1 Häufigkeit

Die Prävalenz der bikuspiden Aortenklappe (engl. *bicuspid aortic valve*; BAV) liegt zwischen 0,4 – 2 %. Damit ist sie die häufigste angeborene Fehlbildung des menschlichen Herzens (Roberts 1970; Ward 2000; Hoffman und Kaplan 2002; Tutar *et al.* 2005). Männer sind mit einem Verhältnis von 3:1 häufiger von einer bikuspiden Aortenklappe betroffen als Frauen (Masri *et al.* 2017). Legt man diesen Daten die Einwohnerzahlen des statistischen Bundesamtes zugrunde, ist die bikuspidale Aortenklappe bei 16.327 bis 81.636 Personen in Sachsen und 330.662 bis 1.653.312 Personen in Deutschland angelegt (Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2015).

1.1.2 Entstehung

Das kardiovaskuläre System ist eines der ersten funktionierenden Systeme im Embryonalstadium eines ungeborenen Kindes. Die zunächst paarig angelegten Herzschräuche verbinden sich zu einem unpaarigen Herzschlauch. Im Laufe der vierten Entwicklungswoche bildet sich aus dem Herzschlauch die Herzschräule. In diesem Stadium existiert ein gemeinsamer Vorhof, das *Atrium communis*, ein gemeinsamer Ventrikel, der *Ventriculus communis*, und ein gemeinsamer Ausflusstrakt, der *Truncus arteriosus*. Die Verbindung zwischen *Atrium communis* und *Ventriculus communis*, der Atrioventrikularkanal, wird durch Endokardkissen in einen rechten und linken Abschnitt geteilt. Am Ende der vierten Entwicklungswoche kommt es zur Bildung des *Septum interventriculare*, das den *Ventriculus communis* in den rechten und linken Ventrikel auftrennt. Durch das Verschmelzen weiterer Endokardkissen kommt es zur Bildung des spiralg angelegten *Septum aorticopulmonale*, das den *Truncus arteriosus* in den *Truncus pulmonalis* und den aufsteigenden Teil der Aorta aufteilt (Aumüller und Wurzing 2010). An den unteren Rändern dieser Endokardkissen entstehen die Basisformen von zwei der drei Taschen der Aortenklappe. Die dritte Tasche geht aus der gegenüberliegenden Seite hervor. In dem Stadium der Bildung der

Aortenklappe, der Valvulogenese, kommt es zur Bildung einer anormalen Klappenformation, der bikuspiden Aortenklappe (Mordi und Tzemos 2012).

Es gibt die Hypothese, dass die Entstehung der bikuspiden Aortenklappe einen genetischen Ursprung hat (Cripe *et al.* 2004; Calloway *et al.* 2011). Bei einer Studie von Huntington *et al.* wurden Verwandte ersten Grades von BAV-Patienten untersucht. 9,1 % der untersuchten Verwandten wiesen ebenfalls die Anlage einer BAV auf. In insgesamt 36,7 % der Familien wurde mindestens ein weiterer Fall mit einer bikuspiden Klappe diagnostiziert, woraufhin ein autosomal-dominanter Erbgang mit reduzierter Penetranz angenommen wurde (Huntington *et al.* 1997).

Da bisher kein einzelnes Gen entdeckt wurde, das für die Anlage einer bikuspiden Klappe kodiert, wird ein heterogener Mechanismus vermutet. In Stammbaumuntersuchungen von Garg *et al.* zeigte sich ein Zusammenhang zwischen Mutationen im NOTCH1-Gen und der bikuspiden Aortenklappe (Garg *et al.* 2005). Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass NOTCH1-Genmutationen auch in 4 % sporadischer Fälle ohne familiäre Prädisposition auftraten (Mohamed *et al.* 2006). In einer Studie von Martin *et al.* kristallisierten sich die Chromosomen-Regionen 18q, 5q und 13q als mögliche Gene heraus, die durch eine Mutation ursächlich für die Anlage einer BAV und anderen kardiovaskulären Malformationen verantwortlich sein können (Martin *et al.* 2007).

Eine zweite Theorie besagt, dass ein veränderter Blutfluss als mögliche Ursache der unvollständigen Trennung der Klappen bei der Valvulogenese in Frage kommt (Fedak *et al.* 2002). Im Besonderen wird die Rolle der extrazellulären Matrix (EZM) diskutiert. Die Proteine der EZM, wie Fibrillin und Fibulin, sind demnach maßgeblich für die Zelldifferenzierung und Klappenformation verantwortlich. Es wird angenommen, dass ein Mangel an Fibrillin-1 während der Valvulogenese zu der Anlage einer bikuspiden Aortenklappe und Ausbildung einer schwächeren Aortenwurzel führt (Fedak *et al.* 2002). In einer Studie von Lee *et al.* wurde zudem eine hohe Prävalenz der BAV bei Mäusen festgestellt, die eine Mangelfunktion der endothelialen NO-Synthase aufwiesen (Lee *et al.* 2000).

1.1.3 Anatomie

Die physiologische Form der Aortenklappe ist die einer trikuspiden Klappe mit drei Taschen, den *Valvulae semilunares*. Die drei *Valvulae semilunares* sind nach einem bestimmten Schema aufgebaut: Die ins Lumen der Aorta hineinragenden Taschen besitzen einen Knoten, den *Nodulus valvae semilunaris*. Dieser stellt die zentrale Kontaktstelle zwischen den einzelnen Taschen dar. Der seitlich vom Knoten abgehende Rand, die *Lunula valvarum seminularium*, verbindet sich ebenfalls mit den Rändern der anderen Taschen. Damit ist ein solider Verschluss der Klappe möglich, der einen Rückfluss des Blutes während der Diastole verhindert (Aumüller und Wurzinger 2010).

Die bikuspidale Aortenklappe hat ein heterogenes Erscheinungsbild. Sievers und Schmidtke entwickelten 2007 ein Klassifikationssystem unter Einbeziehung von 304 Patienten mit BAV (Sievers und Schmidtke 2007). Es erfolgte die Unterscheidung von drei BAV-Typen (dargestellt in Abbildung 1). Typ 0 beschreibt eine „echte“ BAV, mit zwei angelegten Taschen, die nicht durch eine Verbindung von zwei Taschen entstanden sind. Typ 1 weist noch eine Dreiteilung, aber mit einer verwachsenen Raphe auf. Je nachdem, welche Taschen miteinander verbunden sind, können hier drei Untertypen (links-rechts-koronar (L-R); rechts-non-koronar (R-N); non-koronar-links (N-L) voneinander unterschieden werden. Die Bezeichnungen L-R, R-N und N-L leiten sich von der Lage der Taschen zu den Koronarostien ab. L und R befinden sich dabei am linken und rechten Koronarostium und N auf der gegenüberliegenden Seite. Dabei sind die fusionierten Taschen bei einer Typ 1-BAV flächenmäßig kleiner als die Summe zweier Taschen einer trikuspiden Klappe (Mordi und Tzemos 2012). Typ 2 ist durch zwei Raphen charakterisiert (Sievers und Schmidtke 2007).

Normal	Typ 0 ap	Typ 0 lat
Typ 1 L – R	Typ 1 R – N	Typ 1 L – N
Typ 2 L – R / L – N	Typ 2 L – R / R – N	Typ 2 L – N / R – N

Abbildung 1: Schematische Darstellung der BAV-Klappentypen: Die Raphen sind mit einer dicken, durchgezogenen Linie und die Öffnungsstellen mit einer dünnen, gestrichelten Linie gekennzeichnet. Die Koronarostien sind als Kreise dargestellt (angelehnt an Sievers und Schmidtke 2007).

1.1.4 Diagnose

Der Gold-Standard in der Diagnose von Erkrankungen der Herzklappen ist die transthorakale oder transösophageale Echokardiographie. Durch Verkalkungen ist die genaue Verifizierung des Typs der bikuspiden Aortenklappe häufig erst intraoperativ möglich (Pan *et al.* 2015). Zur Etablierung einer praxistauglichen Diagnostik wurden diverse Methoden untersucht. Bei einer Studie von Mills *et al.* wurden BAV-Patienten ohne Stenose der Aortenklappe im *Follow-up* untersucht. Es wurde ein frühsystolisches Ejektionsgeräusch als spezifisches Kriterium für das Vorhandensein einer bikuspiden Klappe angenommen (Mills *et al.* 1978). Der Gold-Standard für die Untersuchung der Aortenklappe ist die transthorakale Echokardiographie (Nishimura *et al.* 2014; Rayner *et al.* 2014). Eine Studie von Chan *et al.* untersuchte die Echokardiographie als Parameter für die Beurteilung bikuspidaler Aortenklappen, hierbei zeigte sich eine hohe Sensitivität von 92 % sowie eine Spezifität von 96 %. Bei weiblichen Patientinnen und Patienten mit

starker Kalzifizierung der Aortenklappe wurde eine Diagnose durch die schlechte Bildqualität erschwert (Chan *et al.* 1999). Diese Limitationen der Echokardiographie bestätigten sich in einer Studie von Tanaka *et al.* 50 Patienten mit einer Aortenklappenstenose, die einen operativen Ersatz der Aortenklappe erhalten sollten, wurden präoperativ mittels Echokardiographie und Kardio-CT untersucht. Die Echokardiographie konnte bei 20 % der Patienten den Klappentyp wegen zu starker Kalzifizierung nicht bestimmen. Die Kardio-CT wird deshalb aufgrund der hohen Sensitivität von 94,1 % und Spezifität von 100 % bei Patienten mit Aortenklappenstenose und speziell Patienten mit einer stark kalzifizierten Klappe empfohlen (Tanaka *et al.* 2010). Trotz der Limitationen der Echokardiographie ist sie nützlich für die Beurteilung eines Großteils der Aortenklappenmorphologien (Verma und Siu 2014; Pan *et al.* 2015) sowie von Vegetationen und systolischer Dysfunktionen der Klappen (Mordi und Tzemos 2012).

In den ESC-Leitlinien von 2014 wird eine Bildgebung der Aortenwurzel und *Aorta ascendens* bei neu diagnostizierten BAV-Patienten empfohlen. Dafür eignet sich die transthorakale Echokardiographie, die auch in *Follow-up* Untersuchungen eingesetzt werden kann. Überschreitet die Aorta den Durchmesser von 45 mm oder wird ein Wachstum von mehr als 3 mm/Jahr erkennbar, sollten weiterführende MRT- oder CT-Bildgebungen erfolgen (Erbel *et al.* 2014).

1.1.5 Komplikationen

Die BAV ist mit einer Vielzahl von Komplikationen assoziiert, deren Häufigkeit und Schwere einen enormen Einfluss auf die gesundheitlichen und sozioökonomischen Verhältnisse der Patienten und der Gesellschaft haben. Diverse Studien beschreiben bei BAV-Patienten ohne hämodynamisch relevante Veränderungen ein 10- bzw. 20-Jahres-Überleben entsprechend dem der Allgemeinbevölkerung (Michelena *et al.* 2008; Tzemos *et al.* 2008). Jedoch zeigt sich ein signifikant erhöhtes Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen insbesondere bei über 50 Jahre alten Patienten. Dazu zählen Herzinsuffizienz, Schlaganfall, Klappenstenose oder -insuffizienz und Endokarditis, gekennzeichnet durch die entsprechenden typischen Symptome wie Dyspnoe, Synkopen und *Angina pectoris* (Russo *et al.* 2002; Michelena *et al.* 2008; Tzemos

et al. 2008). Die proximale Aortopathie, die neben der Bildung von Aortenaneurysmen auch die Aortendissektion und -ruptur umfasst, stellt die schwerwiegendste Form der Komplikationen dar (Ward 2000; Fedak *et al.* 2002; Tzemos *et al.* 2008; Masri *et al.* 2017). Neben der proximalen Aortopathie stehen im Besonderen die Aortenklappenstenose, -insuffizienz und infektiöse Endokarditis als häufige und folgenschwere Komplikationen bikuspiden Klappen im Vordergrund (Ward 2000; Fedak *et al.* 2002; Masri *et al.* 2017). Es wird zudem eine Assoziation zwischen der Anlage einer BAV und dem vermehrten Auftreten von Aortenisthmusstenosen beschrieben (Stewart *et al.* 1993).

1.2 Proximale Aortopathie

1.2.1 Thorakales Aortenaneurysma

Als *Aneurysma verum* versteht man eine Aussackung aller Wandschichten der Arterie bzw. Aorta (*Intima, Media, Adventitia*) über das physiologische Maß hinaus (dargestellt in Abbildung 2). Durch die Aussackung kommt es zur Störung der laminaren Blutströmung und zur Bildung thrombotischer Ablagerungen. Neben der Gefahr der Embolisation besteht ein erhöhtes Risiko für die Entstehung einer Aortendissektion oder -ruptur, die mit einer hohen Mortalität verbunden ist (Henne-Bruns und Barth 2012). Das Aortenaneurysma ist mit einer Prävalenz von 20 - 83 % bei BAV-Patienten beschrieben (Della Corte *et al.* 2007; Jackson *et al.* 2011; Masri *et al.* 2017).

Schon im Kindesalter macht sich die Anlage einer bikuspiden Aortenklappe im Aortendurchmesser bemerkbar. Kinder im Alter von einem Jahr weisen einen Aortendurchmesser auf, der eine Standardabweichung über dem altersentsprechenden Durchschnitt liegt. Bei 14-Jährigen beträgt der Unterschied zwei Standardabweichungen (Holmes *et al.* 2007). Die bikuspidale Klappe ist somit bereits im Kindes- und Jugendalter trotz gleichen Alters, vergleichbarer Körpergröße und hämodynamischer Funktion der Herzklappe ein bedeutender Risikofaktor für die Verminderung der Elastizität und Entwicklung eines Aneurysmas der Aorta (Nistri *et al.* 1999; Pees und Michel-Behnke 2012).



Abbildung 2: Aneurysma der Aorta ascendens (aus Etz *et al.* 2012)

Eine Erklärung für die Entstehung eines Aneurysmas bei Patienten mit bikuspidaler Klappe könnten die erhöhten Scherkräfte an der Aortenwand sein (Nathan *et al.* 2011). Die asymmetrische Formation der BAV mit anormalem Schluss der einzelnen Taschen verursacht spezielle Flussmuster und Turbulenzen (Robicsek *et al.* 2004; Saikrishnan *et al.* 2015). Diese konnten mittels 4D-MRT als helikale systolische Flussmuster identifiziert werden und werden als mögliche Prädiktoren für das Entstehen von Aneurysmen und Dissektionen diskutiert (Robicsek *et al.* 2004; Hope *et al.* 2010).

Ein weiterer relevanter Faktor ist die Klappenmorphologie der BAV. Insbesondere der RN- und RL-Typ weisen erhöhte Scherkräfte an der Aortenwand auf und sind mit einer schnelleren Zunahme des Aortendurchmessers assoziiert (Holmes *et al.* 2007; Barker *et al.* 2012; Mahadevia *et al.* 2014). Dem steht jedoch eine Studie von Jackson *et al.* entgegen, die eine Unabhängigkeit von der Morphologie der Aortenklappe beschreiben und intrinsische Mechanismen als Ursache der Dilatation annehmen (Jackson *et al.* 2011).

Laut diversen Studien birgt die Aortenklappenstenose ein erhöhtes Risiko der Aneurysmabildung (Morgan-Hughes *et al.* 2004; Holmes *et al.* 2007; Michelena *et al.* 2008; Stock *et al.* 2017). Eine Studie von Aydin *et al.* bestätigt diese

Ergebnisse: 34 % der untersuchten Patienten mit schwerer Aortenklappenstenose wiesen ein Aortenaneurysma auf (Aydin *et al.* 2013). Jedoch zeigte sich auch bei Patienten ohne relevante Stenose ebenfalls ein Aneurysma (Pachulski *et al.* 1991; Aydin *et al.* 2013). Das lässt den Schluss zu, dass weitere Faktoren unabhängig von dem Vorhandensein einer Aortenklappenstenose ursächlich für die Entwicklung eines Aortenaneurysmas sind (Pachulski *et al.* 1991; Cecconi *et al.* 2005; Mordi und Tzemos 2012). So zeigte sich bei einem Vergleich von BAV- und TAV-Patienten mit Aortenklappenstenose und vergleichbarer hämodynamischer Störung eine Dilatation der Aorta bei den Patienten mit bikuspider Klappe (Mordi und Tzemos 2012). Andere Studien heben die Insuffizienz der Aortenklappen als bedeutenden Risikofaktor hervor (Keane *et al.* 2000; Thanassoulis *et al.* 2008; Aydin *et al.* 2013). Demnach korreliert die Schwere der Aortenklappeninsuffizienz mit zunehmenden Aortendurchmessern (Keane *et al.* 2000; Thanassoulis *et al.* 2008).

Ein Konsens findet sich vor allem bei der Rolle des Alters der Patienten mit bikuspider Klappe und der Ausbildung eines Aneurysmas. So zeigte sich, dass mit zunehmendem Alter, insbesondere bei Patienten ab 40 Jahren, eine Vergrößerung des Aortendurchmessers zu erwarten ist (Keane *et al.* 2000; Cecconi *et al.* 2005; Thanassoulis *et al.* 2008; Stock *et al.* 2017). Daraus lässt sich schließen, dass die Dilatation der Aorta einem degenerativen Prozess unterliegt. Diese Annahme wird unterstützt durch Untersuchungen, die bei BAV-Patienten mit Aortenklappenstenose durchgeführt wurden. Nach Ersatz der stenosierten Aortenklappe, einem Risikofaktor der Aneurysmabildung, konnte eine sich fortsetzende Dilatation der Aorta festgestellt werden (Michelena *et al.* 2008).

1.2.2 Aortendissektion

Die Aortendissektion beschreibt einen Einriss der *Intima* und *Media* der Aorta. Dadurch gelangt der Blutstrom zwischen die *Intima*, *Media* und *Adventitia* und es kommt zur Ausbildung eines falschen Lumens. Abgehende Gefäße können verlegt werden und die Perfusion unterbrochen sein. Dieser Prozess ist mit einer hohen Mortalität verbunden (Henne-Bruns und Barth 2012). Die Einteilung erfolgt

anhand der Lokalisation und Ausbreitung der Dissektion. Befindet sich der Einriss vor dem Abgang der *A. subclavia sinistra*, spricht man von einer Aortendissektion Stanford Typ A, nach dem Abgang der *A. subclavia sinistra* von einer Aortendissektion Stanford Typ B (Miller *et al.* 1979).

Bei ca. 0,4 – 5 % der BAV-Patienten kommt es zur Dissektion der Aorta (Ward 2000; Guntheroth 2008; Tzemos *et al.* 2008; Michelena *et al.* 2008; Masri *et al.* 2017). Damit ist das Risiko einer Aortendissektion bei Patienten mit bikuspiden Klappen etwa um das Neunfache gegenüber dem Risiko der Allgemeinbevölkerung erhöht (Larson und Edwards 1984; Ward 2000; Michelena *et al.* 2008). Weiterhin erleiden BAV-Patienten durchschnittlich im Alter von knapp 47 Jahren eine Aortendissektion und damit ca. 15 Jahre früher als TAV-Patienten (Etz *et al.* 2015).

Neben der BAV stehen die Krankheitsbilder der unikuspiden Aortenklappe, die arterielle Hypertonie, das Marfan-Syndrom und die Atherosklerose als Risikofaktoren einer Aortendissektion im Vordergrund (Larson und Edwards 1984; Guntheroth 2008). Als Indikator bzw. Prädiktor für eine mögliche Dissektion wird vorrangig der Aortendurchmesser angeführt. So zeigte sich ein 34 % erhöhtes Risiko für eine Dissektion und Ruptur der Aorta bei einem Durchmesser von 6 cm (Elefteriades 2010).

Die Aortendissektion ist mit einer hohen Mortalität verbunden. In einer Studie von Hagan *et al.* wurden 464 Patienten untersucht, von denen 62,3 % eine Typ-A-Dissektion erlitten. Die Gesamtmortalität der Patienten mit Typ-A-Dissektion im Krankenhaus lag bei 27,4 %. Mit chirurgischer Behandlung zeigte sich eine Mortalität von 26 %, während Patienten ohne chirurgischen Eingriff eine Mortalität von 58 % aufwiesen (Hagan *et al.* 2000). Die Mortalität der Erkrankung liegt bei 1 – 2 % pro Stunde (Nienaber und Kodolitsch 1992). Die Bedeutung dieser Zahlen wiegt umso schwerer, da die Inzidenz der Aortendissektion in Deutschland deutlich höher ist als bisher angenommen (11,9 Fälle/100.000 Einwohner/Jahr statt 4,63 Fälle/100.000 Einwohner/Jahr) (Kurz *et al.* 2017).

1.2.3 Therapie

Die einzige kurative therapeutische Option der bikuspiden Aortenklappe und des Aortenaneurysmas ist der chirurgische Ersatz. Konservative medikamentöse Therapien dienen lediglich der Symptomverbesserung und der langsameren Progredienz der Erkrankung (Mordi und Tzemos 2012).

Als medikamentöse Ansatzpunkte der Therapie wurden die Risikofaktoren ins Auge gefasst. So wird in der ACC/AHA-Leitlinie eine strenge Kontrolle des Blutdrucks bei BAV-Patienten empfohlen (Bonow *et al.* 2008). Des Weiteren wurde Doxycyclin als Inhibitor der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) als medikamentöse Therapie diskutiert. So zeigte sich eine signifikant verminderte Wachstumsrate von abdominellen Aortenaneurysmen bei Verabreichung von Doxycyclin (Mosorin *et al.* 2001). Zugleich zeigte sich bei Patienten mit Marfan-Syndrom und einer Behandlung mit Doxycyclin eine Normalisierung der elastischen Fasern und der Aortensteifigkeit (Chung *et al.* 2008).

In den ESC-Leitlinien von 2014 wird die OP-Indikation für einen Ersatz der *Aorta ascendens* bei BAV-Patienten mit geplantem Ersatz der Aortenklappe bei einem Durchmesser der Aorta von ≥ 45 mm gestellt. Weiterhin wird BAV-Patienten mit Risikofaktoren bei einem Durchmesser der *Aorta ascendens* ≥ 50 mm und Patienten ohne Risikofaktoren bei einem Durchmesser ≥ 55 mm ein operativer Ersatz der *Aorta ascendens* empfohlen (Erbel *et al.* 2014). Aber auch asymptomatischen BAV-Patienten mit einer guten Klappenfunktion sollte bei Durchmessern von ≥ 50 mm, einer Wachstumsrate von 5 mm/Jahr, einer geplanten Schwangerschaft oder familiärer Vorbelastung durch Dissektionen, Rupturen oder plötzlichen Herztod eine elektive OP angeraten werden (Etz *et al.* 2012).

Ein routinemäßig durchgeführtes Verfahren zum Ersatz der Aortenklappe und *Aorta ascendens* stellt die Methode nach Bentall und De Bono dar (Bentall und Bono 1968). Zuerst werden die Taschen der Aortenklappe reseziert. Anhand des Durchmessers der Aorta auf Höhe des *Anulus* kann die Größe der Prothese bestimmt werden. Bei den verwendeten Prothesen handelt es sich größtenteils um Dacrondoppelvelourprothesen, die mit Kollagen vorbehandelt wurden. Abgewandelt von der Originalmethode werden die Koronarostien zur besseren

Mobilisation mit einem aortalen Gewebestück aus der Gefäßwand geschnitten. Mit Matratzennähten wird die Prothese in das Aortenfundament eingelassen und verankert. Nun erfolgt der Anschluss der Koronarostien an die Seitenwände der Gefäßprothese. Anschließend wird die Prothese mit dem distalen Anteil der *Aorta ascendens* anastomosiert (Ziemer und Haverich 2010).

Die Aortenklappe ist eine hochkomplexe Struktur mit spezifischen Eigenschaften und Funktionen (Dormand und Mohiaddin 2013). Ein klappenerhaltendes Verfahren ist der Ersatz der *Aorta ascendens* mit Rekonstruktion der Aortenklappe nach Yacoub (siehe Abbildung 3). Bei einer Dilatation der Aortenwurzel kann es trotz intakter Taschen zu einer Insuffizienz der Aortenklappe kommen. Die erweiterte Aortenwurzel und *Aorta ascendens* werden exzidiert und lediglich ein schmaler Rand an Aortengewebe über den Klappen erhalten. Die Aortenklappe wird dabei an ihrer Position belassen. Die Koronarostien werden aus dem Aortengewebe reseziert. Drei Prothesenausläufer werden nun mit dem überstehenden Aortengewebe anastomosiert. Nach dem Anschluss der Koronarostien an die Prothese kann die Anastomosierung mit dem distalen Teil der Aorta vorgenommen werden (Ziemer und Haverich 2010).

Bei der Methode nach Yacoub wird ein Randsaum über der Aortenklappe belassen. Dieser Randsaum ragt zwischen den Prothesenausläufern hervor und ist anfällig für eine sekundäre Dilatation. Um einer Dilatation vorzubeugen, wurde die Methode nach David entwickelt, die eine Modifizierung der Methode nach Yacoub darstellt (siehe Abbildung 3). Hierbei werden die 4-5 mm breiten Kommissuren von der angelegten Prothese komplett überdeckt, um somit eine Dilatation zu verhindern. Die weiteren Schritte der Operation sind mit der ursprünglichen Methode vergleichbar (Ziemer und Haverich 2010).

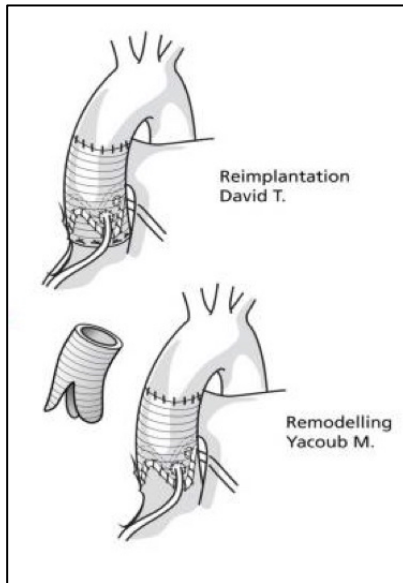


Abbildung 3: OP-Methoden nach David und Yacoub (aus Dormand und Mohiaddin 2013)

Bei BAV-Patienten mit isoliertem Aneurysma der *Aorta ascendens* ohne Beteiligung des *Sinus Valsalvae* wird der suprakommissurale Aortenersatz empfohlen (Etz *et al.* 2012). Bei dieser Methode ist der Aortenersatz auf den suprakommissuralen Anteil der Aorta begrenzt und damit in seinem Umfang wesentlich reduziert (Ziemer und Haverich 2010).

1.3 Extrazelluläre Matrix und mechanische Eigenschaften der Aorta

Die extrazelluläre Matrix (EZM) ist ubiquitär in den Organen und Geweben des menschlichen Körpers vorhanden. Sie ist eine Schlüsselkomponente in der Regulation verschiedener biologischer Strukturen und verantwortlich für diverse Zell-Matrix-Interaktionen. Durch Veränderungen ihrer Zusammensetzung und einzelner Bestandteile wird ihre Bedeutung für die Entstehung einer Vielzahl von Krankheitsbildern ersichtlich (Cheheltani *et al.* 2014; Heinrich *et al.* 2014). In Blutgefäßen spielt die EZM eine große Rolle für die strukturelle Integrität der Gefäßwand und die Interaktion von Sekretionsprodukten und Molekülen aus den Gefäßzellen und dem Blut (Didangelos *et al.* 2010). Die EZM besteht aus Faserproteinen wie Elastin, Kollagen und Fibrillin sowie Proteoglykanen, Glykoproteinen und Glykosaminoglykanen (Dollery *et al.* 1995; Niwa *et al.* 2001; Heinrich *et al.* 2014; Halper und Kjaer 2014; Cheheltani *et al.* 2014).

Da die EZM stetigen Auf- und Abbauprozessen unterliegt (Toda *et al.* 1980), ist sie empfänglich für pathologische Veränderungen ihrer Struktur (Dollery *et al.* 1995). Jedoch kennzeichnen diese Prozesse ebenfalls die besonderen Verformungseigenschaften, mit denen die EZM auf externe Faktoren reagieren kann. Bei BAV-Patienten zeigte sich mit zunehmendem Alter jedoch eine Verminderung der Flexibilität und eine zunehmende Steifigkeit der Aorta (Greenwald 2007; Zulliger und Stergiopulos 2007; Santarpia *et al.* 2012). Die unmittelbaren Folgen sind eine verminderte Compliance der Gefäßwand und erhöhte Blutdruckamplitude (Zulliger und Stergiopulos 2007). Ein Zusammenhang zwischen den Veränderungen der EZM und der verminderten Verformbarkeit sowie zunehmenden Steifigkeit von Gefäßen wurde in diversen Studien hinreichend belegt (Samila und Carter 1981; Whittle *et al.* 1990; Greenwald 2007; Cheheltani *et al.* 2014).

1.3.1 Elastin

Elastin ist ein unlösliches Polymer, das aus dem monomeren löslichen Tropoelastin entsteht. Durch Vernetzung des Elastins durch Fibrillin entstehen elastische Fasern. Die hohe Flexibilität dieser elastischen Fasern beruht auf hydrophoben Anteilen des Elastins, die von einem Wassermantel umgeben sind (Heinrich *et al.* 2014; Halper und Kjaer 2014).

Elastin ist der Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix der Aorta (Cheheltani *et al.* 2014). Es ist verantwortlich für die elastische Widerstandsfähigkeit und Rückstellkräfte der Aorta (Heinrich *et al.* 2014; Halper und Kjaer 2014). Durch die Windkesselfunktion der Aorta muss diese insbesondere in den herznahen Regionen eine hohe elastische Verformbarkeit aufweisen. Folglich zeigt sich eine erhöhte Elastinkonzentration in dem thorakalen Bereich der Aorta, die mit distalem Verlauf abnimmt (Gasser *et al.* 2006). Elastin unterliegt einem altersabhängigen Prozess, der die elastischen Strukturen mit zunehmendem Alter fragmentiert und in ihrer Funktion einschränkt (Myers und Lang 1946; Faber und Møller-Hou 1952; Schlatmann und Becker 1977). Dieser Prozess wird durch Pathologien wie die arterielle Hypertonie und die Anlage einer bikuspiden Klappe verstärkt (Sans und Moragas 1993; Tsamis *et al.* 2013).

1.3.2 Kollagen

Kollagen ist ein wesentlicher Bestandteil der EZM und von diversen Weichgeweben im menschlichen Körper (Halper und Kjaer 2014). Es setzt sich aus einer Tripelhelix zusammen, die aus Glycin und zwei weiteren Aminosäuren besteht. Häufig handelt es sich hierbei um Prolin und Hydroxyprolin (Heinrich *et al.* 2014). Dabei verhält sich insbesondere Hydroxyprolin proportional zum Gehalt an Kollagen (Tsamis *et al.* 2013).

Kollagen ist eine wichtige Komponente der Arterienstruktur. Während Elastin für die elastische Verformbarkeit bei mechanischer Belastung zuständig ist, zeigt sich Kollagen für eine zunehmende Steifigkeit bei vermehrter Belastung verantwortlich (Samila und Carter 1981). Im Vergleich zu Elastin ist Kollagen mit einer 100 – 1000-fach erhöhten Steifigkeit assoziiert (Greenwald 2007). Andererseits zeigt sich eine Vermehrung des Kollagenanteils in der Aortenwand mit zunehmendem Alter (Myers und Lang 1946; Schlatmann und Becker 1977; Sans und Moragas 1993). Hinter dieser Fibrosierung, die vorrangig die *Media* der Gefäßwand betrifft, wird ein Reparaturmechanismus vermutet, der eine Antwort auf die mechanische Belastung darstellen könnte (Schlatmann und Becker 1977).

1.3.3 Glykosaminoglykane und Proteoglykane

Glykosaminoglykane (GAG) sind aus Disaccharideinheiten aufgebaute Kohlenhydrate. Sie bilden die Grundsubstanz der EZM und erscheinen dort in freier Form oder an Glykoproteine gebunden. Das einzige nicht-sulfatierte Glykosaminoglykan ist die Hyaluronsäure. Sie bildet in wässriger Umgebung hydratisierte Gele und ist an diversen Prozessen der Zellwanderung, Wundheilung, Metastasierung und des oxidativen Stresses beteiligt. Neben der Hyaluronsäure zählen Heparin und die proteingebundenen und sulfatierten Heparansulfat, Chondroitinsulfat, Dermatansulfat und Keratansulfat zu den Glykosaminoglykanen (Heinrich *et al.* 2014).

Proteoglykane (PG) sind Glykoproteine, die kovalent gebundene GAG als Seitenketten aufweisen. Durch Ionisierung der Sulfatgruppen der GAG bei physiologischem pH-Wert kommt es, bedingt durch eine hohe

Ionenkonzentration, zu einem osmotisch bedingten Wassereinstrom. Ein wichtiges Proteoglykan stellt Biglycan dar. Dieses ist u.a. an der Regulation der Wachstumsfaktoren, Entzündungsmediatoren und Entwicklung von Strukturen in der EZM beteiligt (Heinrich *et al.* 2014).

Vergleicht man thorakale Aortenaneurysmen mit abdominalen und zerebralen Aneurysmen, zeigen sich drei vergleichbare Eigenschaften. Dazu zählen der Verlust elastischer Fasern und glatter Muskelzellen sowie das Remodeling von Kollagen. Ein bedeutendes Alleinstellungsmerkmal thorakaler Aneurysmen stellt jedoch die übermäßige Akkumulation der GAG und PG dar. Auffällig ist zudem das deutlich erhöhte Risiko der Aortendissektion bei thorakalen Aneurysmen (Roccabianca *et al.* 2014b). Mit der Zerstörung der physiologischen Struktur der Aortenwand kommt es zur Zunahme an GAG und PG (Schlatmann und Becker 1977; Whittle *et al.* 1990; Roccabianca *et al.* 2014b). Die osmotischen Eigenschaften führen zu einem Wassereinstrom, den man als *Donnan-Schwellung* bezeichnet. Unter Beachtung der erhöhten Dissektionsrate thorakaler Aortenaneurysmen könnte die *Donnan-Schwellung* einen potenziellen Risikofaktor oder die Ursache der Aortendissektion darstellen (Roccabianca *et al.* 2014b).

2 Zielstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, anhand der mechanischen Eigenschaften und der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix der Aorta mögliche Risikofaktoren und Ursachen der Aortendissektion zu identifizieren. Die Aortendissektion Typ A stellt einen akuten, lebensbedrohlichen Notfall mit hoher Mortalität dar. Insbesondere BAV-Patienten sind aufgrund des erhöhten Risikos für eine Aortendissektion einer großen gesundheitlichen und psychischen Belastung ausgesetzt.

Als Prädiktoren der Aortendissektion werden bisher lediglich der Aortendurchmesser und sein Wachstum beschrieben. Jedoch erhärtet sich die Meinung, dass ein Bedarf an größenunabhängigen Markern besteht, um das Dissektionsrisiko von BAV-Patienten zu bestimmen (Michelena *et al.* 2008). In diesem Zusammenhang werden die biomechanischen Eigenschaften der Aorta als verlässlicherer Parameter des Rupturrisikos, verglichen mit dem Aortendurchmesser, diskutiert (Cheheltani *et al.* 2014).

An thorakalen Aortenproben von BAV- und TAV-Patienten werden die biomechanischen Eigenschaften der Aorta bestimmt. Die Proben werden einem Test auf Reißfestigkeit unterzogen und es soll eine Quantifizierung einzelner Komponenten der extrazellulären Matrix stattfinden.

Daraus ergeben sich verschiedene Fragestellungen:

1. Welchen Einfluss hat die Anlage einer bikuspiden Aortenklappe auf die mechanischen Eigenschaften der Aortenwand?
2. Gibt es Unterschiede in der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix und welche Einflüsse haben diese auf die mechanischen Eigenschaften?
3. Ist die Anlage einer bikuspiden Aortenklappe mit einer Umverteilung oder übermäßigen Clusterbildung von Glykosamino- und Proteoglykanen assoziiert?
4. Wie beeinflusst die Anlage einer bikuspiden Klappe die Stärke der Aortenwand und deren Kalzifizierungsgrad?

3 Material

3.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank Heracell™ 240	Heraeus Instruments, Thermo Fisher Scientific; Dreieich, Deutschland
Cast-It Gelgießstand (Model: 45-2010)	Peqlab Biotechnologie GmbH; Erlangen, Deutschland
Epoch™ Microplate Spectrophotometer	BioTek; Berlin, Deutschland
Eppendorf-Pipetten Research® plus (1000 µl, 200 µl, 100 µl, 10 µl, 2,5 µl)	Eppendorf Research; Hamburg, Deutschland
Feinwaage	Sartorius; Göttingen, Deutschland
FUJINON 1:1.4/16mm; HF16HA-1B	FUJIFILM Europe GmbH; Düsseldorf, Deutschland
Fusion-FX7	Vilber Lourmat; Eberhardzell, Deutschland
Gefrierschrank	Liebherr, Premium, Bosch; Stuttgart, Deutschland
Gewebeinfiltrationsautomat TP1020	Leica Camera AG; Wetzlar, Deutschland
HL-2000 HybriLinker	Ultra-Violet Products; Cambridge, Großbritannien
Ice Flaker	BREMA®IceMakers; Milano, Italien
Inkubator 1000	Heidolph Instruments GmbH; Schwabach, Deutschland
Kipprollenmischer RS-TR05	Phoenix Instrument GmbH; Garbsen, Deutschland

Gerät	Hersteller
Kühlplatte EG1150C	Leica Camera AG; Wetzlar, Deutschland
Kühlschrank	Siemens Home Appliance; München, Deutschland
Microtom HM 355S	Thermo Fisher Scientific; Dreieich, Deutschland
MR Hei-Standard	Heidolph Instruments GmbH; Schwabach, Deutschland
Paraffinausgießstation EG1150H	Leica Camera AG; Wetzlar, Deutschland
Paraffinstrecktisch HI1220	Leica Camera AG; Wetzlar, Deutschland
pH-Meter	VWR™ International; Darmstadt, Deutschland
pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH; Eberstadt, Deutschland
Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH; Schwabach, Deutschland
PowerPac™ Basic	Bio-Rad Laboratories Inc.; München, Deutschland
PowerPac™ HC	Bio-Rad Laboratories Inc.; München, Deutschland
Reinwassersystem Lab Tower AFT 40	Thermo Fisher Scientific; Dreieich, Deutschland
Tensile Stage MT200	Deben; London, Großbritannien
Thermomixer compact	Eppendorf Research; Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf Research; Hamburg Deutschland
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf Research; Hamburg, Deutschland

Gerät	Hersteller
Tischzentrifuge Sprout™	Heathrow Scientific® LLC; Illinois, USA
TissueLyser II	Qiagen; Hilden, Deutschland
Vortex-Genie®2	Scientific Industries, Inc.; Bohemia, USA
Wasserbad GFL® 1003	Thermo Fisher Scientific; Dreieich, Deutschland
Wasserbad HI1210	Leica Camera AG; Wetzlar, Deutschland

3.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
96-Well Platte	Eppendorf Research; Hamburg, Deutschland
Cellstar® Serologische Pipette	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen, Deutschland
Injekt 2 ml	B. Braun Melsungen AG; Melsungen, Deutschland
MENZEL-Deckgläser 24x60 mm	Thermo Fisher Scientific; Dreieich, Deutschland
MENZEL-Objektträger Superfrost Plus	Thermo Fisher Scientific; Dreieich, Deutschland
Microlance™ 3	Becton Dickinson GmbH; Heidelberg, Deutschland
Pasteurpipetten	Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland
Pinzette	Leica Camera AG; Wetzlar, Deutschland
Pipettenspitzen (1000 µl, 200 µl, 10 µl)	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen, Deutschland

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Polypropylenröhrchen (50 ml, 15 ml)	Nerbe plus GmbH; Winsen, Deutschland
PVDF-Membran (Porengröße 0,45 µm)	Carl Roth; Karlsruhe Deutschland
Reaktionsgefäße (5 ml, 2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml)	Eppendorf Research; Hamburg, Deutschland
Skalpell	B. Braun Aesculap AG; Tuttlingen, Deutschland
WesternSure™ Pen	LI-COR Biosciences; Bad Homburg, Deutschland
Whatman®-Papier	GE Healthcare; Braunschweig, Deutschland

3.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich; München, Deutschland
2-Propanol	Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland
4x Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad Laboratories Inc.; München, Deutschland
Acrylamid/Bisacrylamid (AA/Bis)	SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem GmbH; Darmstadt, Deutschland
Antibody Diluent	Zytomed Systems; Berlin, Deutschland
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific; Dreieich, Deutschland
BlueBlock PF (10x)	SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg, Deutschland

Chemikalie	Hersteller
Blyscan Glycosaminoglycan Assay	Biocolor Ltd; Carrickfergus, Großbritannien
Coomassie Brilliant Blue R-250	Thermo Fisher Scientific; Dreieich, Deutschland
CV Mount	Leica Camera AG; Wetzlar, Deutschland
EDTA	Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure-N Buthylester	Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure ROTIPURAN® 100 %, p.a.	Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland
Ethanol vergällt ≥ 99,8 %	Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland
Fastin Elastin Assay	Biocolor Ltd; Carrickfergus, Großbritannien
Formalin 37 %	Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich; München, Deutschland
Glycin	SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg, Deutschland
L-Cystein-HCl	Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland

Chemikalie	Hersteller
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland
Papain Papaya latex	Sigma-Aldrich; München, Deutschland
Paraffin	Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland
Pierce® RIPA Buffer	Thermo Fisher Scientific; Dreieich, Deutschland
Phosphatpuffer (PBS) (1x Dulbecco's) Pulver	AppliChem GmbH; Darmstadt, Deutschland
Ponceau S	Sigma-Aldrich; München, Deutschland
Proteinase K	Affymetrix; Santa Clara, USA
Purple-Jelley Hyaluronan Assay	Biocolor Ltd; Carrickfergus, Großbritannien
RNA TM /ater	Quiagen; Hilden, Deutschland
Roti®Plast Paraffin	Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure ROTIPURAN® 37 %, reinst	Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland
SERVALightVega	SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg, Deutschland
SIGMAFAST TM 3,3'- Diaminobenzidine tablets	Sigma-Aldrich; München, Deutschland
Total Collagen Assay Kit (Perchlorate-Free)	Novus Biologicals; Wiesbaden, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)- aminomethanhydrochlorid (Tris-HCl)	Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland

Chemikalie	Hersteller
Tween®20	Sigma-Aldrich; München, Deutschland

3.4 Antikörper

3.4.1 Primärantikörper

Antikörper	Hersteller
Maus – IgG2a – anti-Biglycan – AK (polyklonal) ab54855	Abcam; Cambridge, Großbritannien
Maus – IgG1 – anti-GAPDH – AK (monoklonal)	Hytest; Turku, Finnland

3.4.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller
Rabbit – anti – Mouse IgG A9044	Sigma-Aldrich; München, Deutschland

3.5 Software

Software	Hersteller
Deben Microtest (Version 6.1.83)	Deben; London, Großbritannien
Excel, Microsoft Office 2016	Microsoft Deutschland GmbH; Unterschleißheim, Deutschland
Fusion Capt (Version 16.07)	Vilber Lourmat; Eberhardzell, Deutschland
Gen5	BioTek; Berlin, Deutschland
ImageJ (Version 1.46r)	Fiji
OriginPro 9G	OriginLab; Northampton, USA

Software	Hersteller
Pannoramic Viewer (Version 1.15.4)	3DHISTECH; Budapest, Ungarn
Powerpoint, Microsoft Office 2016	Microsoft Deutschland GmbH; Unterschleißheim, Deutschland
uEye Cockpit	IDS Image Development Systems GmbH; Obersulm, Deutschland
Word, Microsoft Office 2016	Microsoft Deutschland GmbH; Unterschleißheim, Deutschland

4 Methoden

4.1 Patientenpopulation

Der Studie wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Leipzig genehmigt (Antrags-Nr.: 177/15-ek). Die Patienten wurden vor dem operativen Eingriff aufgeklärt und erteilten ihre schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an der Studie. Es wurden 102 Patienten in die Studie eingeschlossen. Diese wurden nach ihrem Klappentyp in zwei Gruppen eingeteilt: In Gruppe 1 waren die Patienten mit bikuspidaler Aortenklappe, in Gruppe 2 waren die Patienten mit trikuspidaler Aortenklappe.

4.2 Präparation der Aorta

Die Entnahme des Aortengewebes erfolgte während des operativen Ersatzes der *Aorta Ascendens*. Die Probe wurde gemäß dem dargestellten Schema in Abbildung 5 in vier Abschnitte (V – konvex, K – konkav, A – abdominal, D – dorsal) eingeteilt, präpariert und entsprechendes Material für das Stretching, die Histologie und weitere Untersuchungen verarbeitet. Getestet wurde sowohl die konkave K- als auch die konvexe V-Seite der entsprechenden Probe, sofern ausreichend Material vorhanden war.



Abbildung 4: Bei der OP entnommenes Aortengewebe.

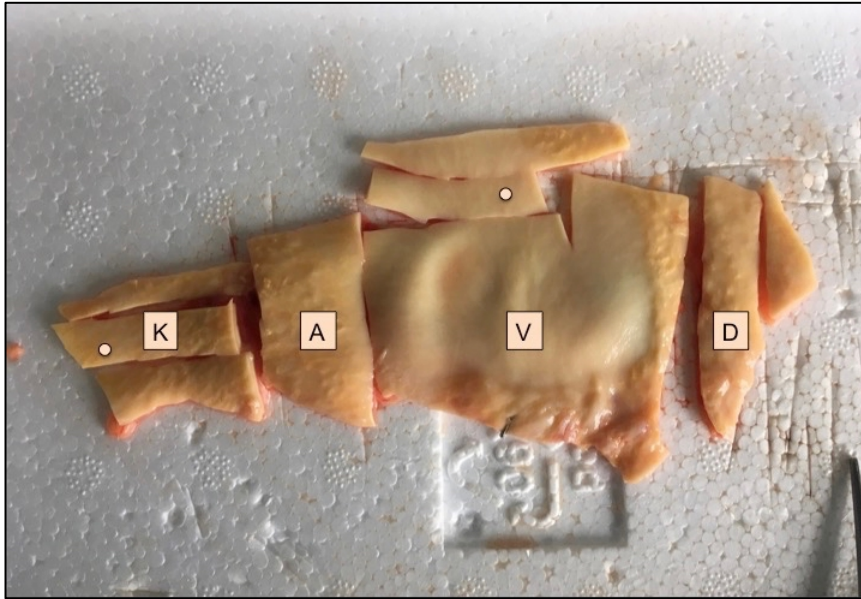


Abbildung 5: Auftrennung des Testmaterials. Einteilung des Gewebes in die Anteile konkav (K), abdominal (A), konvex (V), dorsal (D), Stretching-Material mit einem Punkt markiert.

4.3 Biomechanisches Stretching

Der biomechanische Zugversuch diente der Bestimmung der Elastizität und des Reißverhaltens der untersuchten Aortenproben.

Vom Aortengewebe wurden ca. 3x1 cm große Stücke für den Zugversuch präpariert (siehe Abbildung 5). Anschließend wurden diese in NaCl-Lösung verbracht und auf Eis gekühlt, umgehend ins Leibniz-Institut für Oberflächenmodifizierung e.V. (IOM) transportiert. Dort wurde die Probe nach kurzem Abtupfen der überschüssigen Flüssigkeit auf die Zugapparatur (*Tensile Stage*) aufgelegt. Zwei gezahnte Probenhalter wurden auf beide Enden gelegt und mit jeweils zwei Schrauben fixiert, um ein Herausrutschen der Probe bei dem tatsächlichen Versuch zu verhindern. Um eine zusätzliche Fixierung der Aortenprobe zu gewährleisten, wurde auf die untere Auflagefläche handelsübliches Schleifpapier mit doppelseitigem Klebeband befestigt. Im Anschluss wurde die Breite und Dicke der Aortenprobe mit einem Messschieber (Messgenauigkeit von 0,1 mm) gemessen. Die *Tensile Stage* wurde mit dem Programm Deben Microtest verbunden, über das die Kraft-Abstand-Kurven aufgezeichnet wurden. Über das Programm uEye Cockpit und die Kamera FUJINON wurde der Versuch per Video aufgezeichnet. Anschließend wurde der Zugversuch gestartet.

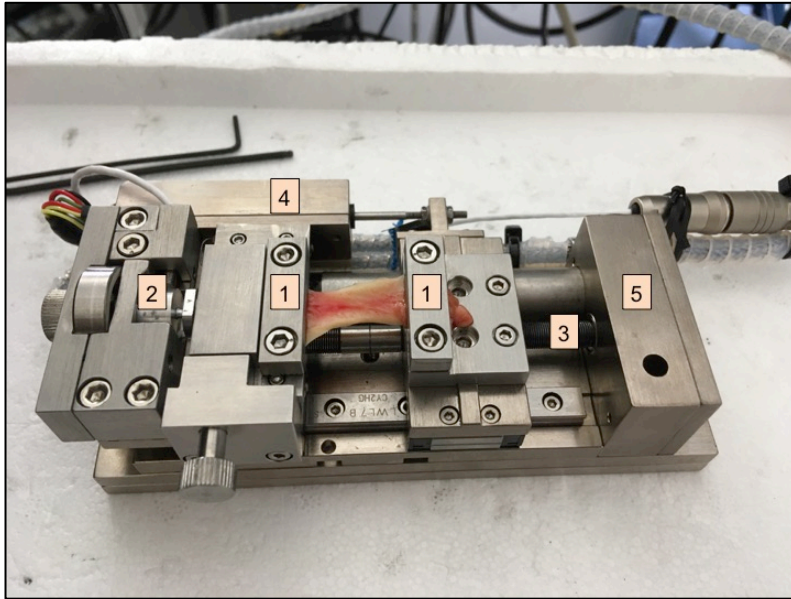


Abbildung 6: Tensile Stage mit Aortenprobe. 1 Probenhalter, 2 Kraftzelle, 3 Gewindeschraube, 4 Elongometer, 5 Getriebe.

Ein Getriebe sorgt über eine Gewindeschraube für ein Auseinanderziehen (Stretching) der Aortenprobe mit 1,5 mm pro Minute. Die Längenänderung wurde von dem Elongometer und die verwendete Kraft in Newton (N) von der Kraftzelle detektiert.

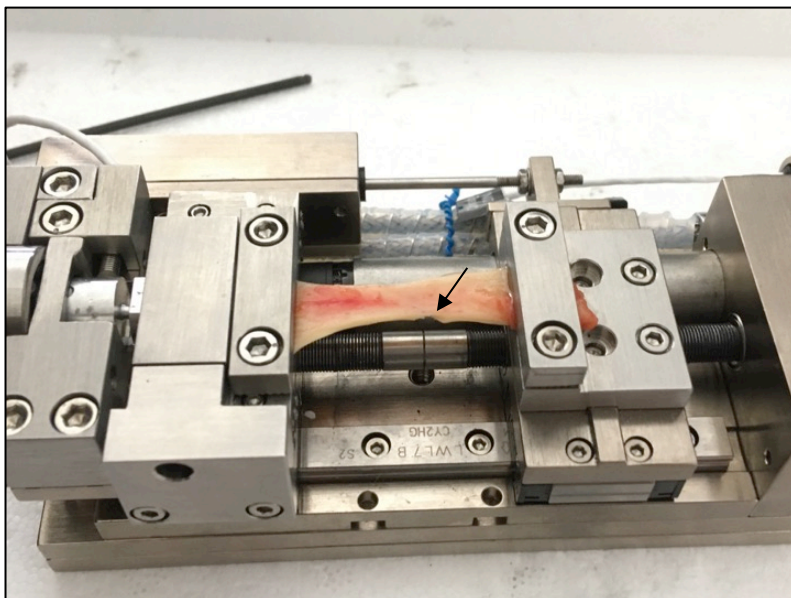


Abbildung 7: Gestreckte Aorta: Am unteren Rand ist bereits ein leichter Einriss erkennbar (schwarzer Pfeil).

Der Versuch wurde durchgeführt, bis die jeweilige Probe gerissen oder das Maximum der *Tensile Stage* bei 20 mm bzw. das Maximum der Kraftzelle bei 20 N erreicht war.

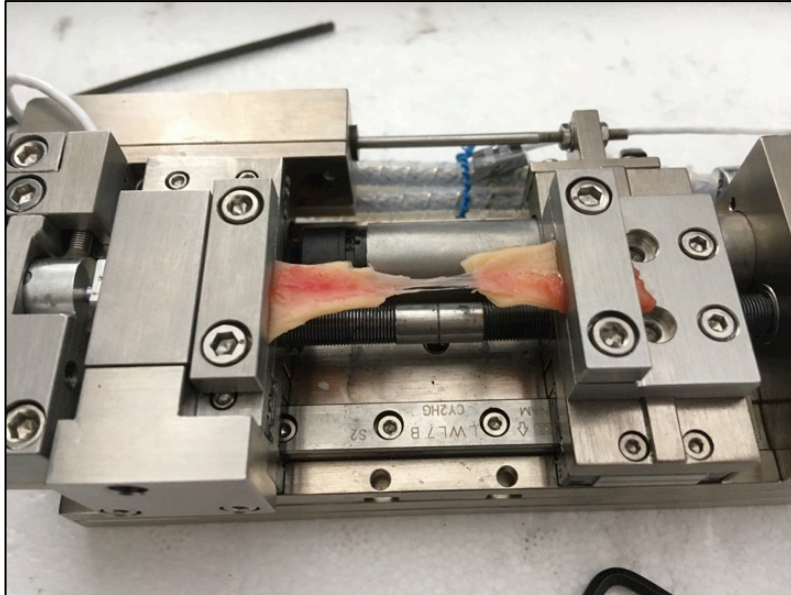


Abbildung 8: Gerissene Aorta.

4.4 Auswertung des Stretchings

Nach dem abgeschlossenen Zugversuch wurde die Querschnittsfläche durch Multiplikation der vorher gemessenen Breite und Dicke der Aortenprobe berechnet, um die Spannung (σ , Stress) zu berechnen.

$$\sigma = \frac{F}{A}$$

F = applizierte Kraft; A = Querschnittsfläche

Die Dehnung (ε , Strain) berechnete sich darüber, wie weit die Aortenprobe von ihrem Originalzustand (20mm) abwich.

$$\varepsilon = \frac{\Delta L}{L}$$

ΔL = Längenänderung; L = Ursprungslänge

Durch Eintragen der Spannung und Dehnung der jeweiligen Probe in ein Koordinatensystem wurde eine *Stress-Strain-Kurve* erzeugt. Anhand des

Anstiegs dieser Kurve wurde das Elastizitätsmodul (E) bestimmt. Dabei gilt: Je höher das Elastizitätsmodul, desto höher ist die Steifigkeit der jeweiligen Aortenprobe.

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon}$$

σ = Stress; ε = Strain

Die Auswertung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Leibniz-Institut für Oberflächenmodifizierung e.V. (IOM).

4.5 Hyaluronsäure-Assay

Das Purple-Jelley Hyaluronsäure-Assay von Biocolor diene der quantitativen Bestimmung der Hyaluronsäure, des einzigen nicht-sulfatierten Glykosaminoglykanes. Bei dieser Methode wurden die sulfatierten Glykosaminoglykane mittels Präzipitation entfernt. Über die Bindung des Farbstoffes *Purple Dye Reagent* an die Hyaluronsäure wurde ein Absorptionsmaximum erzeugt, das anschließend photometrisch gemessen werden konnte.

Das Aortengewebe wurde auf 50 ± 20 mg abgewogen. Die Proben wurden anschließend in Eppendorfgefäße (Röhrchen) mit Schraubverschluss verstaut. Vor Durchführung des Assays erfolgte ein Proteinverdau mit TRIS-HCl und Proteinase K, um Proteine, die ebenfalls den Farbstoff binden können, zu entfernen. Dazu wurden jeweils 400 μ l TRIS-HCl Puffer (pH 7,6) sowie 20 μ l Proteinase K in die Röhrchen pipettiert und diese über Nacht bei 55°C inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 12.000 x g für zehn Minuten. Der Überstand wurde in neue Eppendorfgefäße übertragen. Nun erfolgte die Zugabe von 1 ml GAG-Präzipitationsreagenz zum Ausfällen der Glykosaminoglykane. Dabei wurden alle Proben, Standard und Blank in Duplikaten getestet. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde mit 12.000 x g für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 360 μ l *Aqua dest.* in jedes Röhrchen hinzugegeben. Anschließend wurden die Röhrchen mit einem Vortex-Mixer gemischt und für 15 Minuten in einem Thermomixer inkubiert. Zur Isolation der Hyaluronsäure wurden die sulfatierten

Glykosaminoglykane in einem zweistufigen Prozess mit NaCl-Lösung und Cetylpyridiniumchlorid (CPC) entfernt. Es erfolgte die Zugabe von 40 µl konzentrierter NaCl-Lösung und 95 µl CPC. Im Anschluss wurden die Röhrchen für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mit 12.000 x g für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Eppendorfgefäße transferiert. Es erfolgte die Zugabe von 1 ml GAG-Präzipitationsreagenz. Anschließend wurden die Röhrchen für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 12.000 x g für zehn Minuten wurde der Überstand verworfen und 300 µl *Aqua dest.* zum Rückstand hinzugegeben. Die Röhrchen wurden per Vortex-Mixer gemischt und für 15 Minuten auf einem Thermomixer geschüttelt. Es wurden 33 µl konzentrierte NaCl-Lösung und 77 µl CPC hinzugegeben, um die verbliebenen sulfatierten Glykosaminoglykane zu entfernen. Die Röhrchen wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden diese mit 12.000 x g für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Eppendorfgefäße übertragen. Zu dem Überstand wurde 1 ml GAG-Präzipitationsreagenz hinzugefügt. Nach dem Mixen der Röhrchen wurden diese für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für zehn Minuten bei 12.000 x g. Der Überstand wurde verworfen und 500 µl 98%-iges Ethanol hinzugegeben. Es erfolgte die erneute Zentrifugation bei 12.000 x g für fünf Minuten ohne vorheriges Durchmischen. Der Überstand wurde verworfen, die Röhrchen umgedreht und auf absorbierendes Papier gestellt, um verbliebene Flüssigkeitsreste zu entfernen. Es wurden jeweils 100 µl *Aqua dest.* in die Röhrchen gegeben und diese gründlich gemischt. Anschließend wurden die Röhrchen für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 20 µl aus jedem Röhrchen der Standardreihe, des Blanks und der Proben auf eine 96-Well-Platte übertragen. Es wurden jeweils 200 µl des Farbstoffreagenzes *Purple Dye Reagent* in die entsprechenden Wells eingefüllt. Die Entwicklung der Farbreaktion erfolgte in Dunkelheit für zehn Minuten. Das *Purple Dye Reagent* band an die verbliebene Hyaluronsäure und erzeugte ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 655 nm, deren Extinktion photometrisch gemessen werden konnte. Die Konzentrationsbestimmung der Hyaluronsäure erfolgte anhand der mitgeführten Standardreihe.

4.6 Glykosaminoglykan-Assay

Zur Quantifizierung der sulfatierten Glykosaminoglykane (sGAG) wurde das Blyscan Sulfated Glycosaminoglycan Assay von Biocolor verwendet. Die Gesamtmenge der sGAG Chondroitinsulfat, Keratansulfat, Dermatansulfat und Heparansulfat konnte über die Bindung des Farbstoffes Dimethylmethylenblau photometrisch bestimmt werden.

Das zu untersuchende Aortengewebe wurde auf 20 ± 10 mg abgewogen und in Eppendorfgefäße verstaute. Die Gewebeproben wurden mit 500 µl des Papainextraktionsreagenzes versetzt. Die Gewebshomogenisierung erfolgte durch einen Tissue Lyser (Firma Qiagen), mit dem das Aortengewebe für fünf Minuten mit einer Frequenz von 30/s zerstört wurde. Nach Zugabe von weiteren 500 µl des Papainextraktionsreagenzes und 5 µl Papain erfolgte die Inkubation der Proben bei 65°C über Nacht. Anschließend wurden die Röhrchen bei 10.000 x g für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Quantifizierung abpipettiert. Anschließend wurden 20 bzw. 25 µl des erhaltenen Überstandes mit PBS auf 100 µl aufgefüllt und in Eppendorfgefäße übertragen. Daneben wurden Röhrchen mit 100 µl PBS für den Blank sowie 100 µl des Standards gemäß der vorgegebenen Standardreihe (1, 2, 3, 4, 5 µg) gefüllt und in Duplikaten getestet. Zu jedem Röhrchen wurde 1 ml Dimethylmethylenblau zugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Thermomixer geschüttelt. Hierbei erfolgte die Ausfällung der angefärbten sulfatierten Glykosaminoglykane. Anschließend wurden die Röhrchen bei 12.000 x g für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, um jegliche Flüssigkeitsreste zu entfernen. Danach wurde jeweils 500 µl des Dissoziationsreagenzes in die Röhrchen dazugegeben. Die Röhrchen wurden auf einem Thermomixer für zehn Minuten bei Raumtemperatur gemixt, um den entstandenen Farbkomplex in Lösung zu bringen. Danach wurden jeweils 200 µl aus jedem Röhrchen auf die 96-Well-Platte aufgetragen und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 656 nm gemessen. Anhand der Standardreihe konnten die Konzentrationen der sGAG in den Aortenproben bestimmt werden.

4.7 Elastin-Assay

Zur Quantifizierung des Elastin-Anteils diente das Fastin Elastin Assay Kit von Biocolor. Um das ungelöste Elastin in seine wasserlösliche Form, das α -Elastin, umzuwandeln, wurde das Gewebe einer Extraktion mit Oxalsäure unterzogen. Durch Verbindung mit Tetraphenylporphintetrasulfonat (TPPS) wurde das Elastin angefärbt, konnte in Lösung gebracht und schließlich photometrisch gemessen werden.

Die Aortenproben wurden geschnitten und auf $15 \pm 7,5$ mg abgewogen. Anschließend wurde das Gewebe in Eppendorfgefäße übertragen und 750 μ l 0.25 M Oxalsäure hinzugegeben. Danach erfolgte die Inkubation der geöffneten Röhrchen für 60 Minuten bei 100°C in einem Hybridisierungssofen. Anschließend wurden die Röhrchen auf Raumtemperatur abgekühlt und für zehn Minuten bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Eppendorfgefäße übertragen. Danach erfolgte ein zweiter Extraktionsschritt mit Zugabe von 750 μ l 0.25 M Oxalsäure zu dem verbliebenen Pellet und 60-minütiger Inkubation bei 100°C. Nach einer Zentrifugation für zehn Minuten bei 10.000 x g wurde der Überstand zu dem im ersten Extraktionsschritt erhaltenen Lysat hinzugefügt. Anschließend wurden 50 μ l des Lysates in neue Eppendorfgefäße übertragen. Es wurden 50 μ l der Präzipitationslösung hinzugefügt, um das Elastin ausfallen zu lassen. Zudem wurde zu einem Blank bestehend aus 100 μ l 0.25 M Oxalsäure, 100 μ l der Präzipitationslösung hinzugefügt und zu der Standardreihe von 12.5, 25 und 50 μ l des α -Elastin-Standards eine entsprechend gleich große Menge (12.5, 25, 50 μ l) an Präzipitationslösung zugegeben. Die Proben, der Blank und die Standardreihe wurden als Duplikate behandelt und gemessen. Die Röhrchen wurden mit einem Vortex-Mixer durchmischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Röhrchen bei 10.000 x g für zehn Minuten. Der entstandene Überstand wurde verworfen und die Röhrchen auf absorbierendem Papier ausgeklopft, um verbliebene Flüssigkeitsreste zu entfernen. Es erfolgte die Zugabe von 1 ml TPPS. Nach kurzem Durchmischen der Röhrchen wurden diese für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Röhrchen wurden für zehn Minuten bei

10.000 x g zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Es wurden nun 250 µl des Dissoziationsreagenz hinzugefügt und mit einem Vortex-Mixer durchmischt, um die vollständige Lösung des Farbkomplexes zu gewährleisten. Danach wurden jeweils 150 µl des Blanks, der Standardreihe und der Proben in die Wells einer 96-Well-Platte aufgetragen und deren Extinktion bei einer Wellenlänge von 513 nm gemessen. Anhand des mitgeführten Standards konnten die jeweiligen Konzentrationen berechnet werden.

4.8 Kollagen-Assay

Zur Quantifizierung des Kollagen-Anteils wurde das Total Collagen Assay Kit von Novus Biologicals verwendet. Hydroxyprolin, das zu 12 – 14 % das Gewicht des Kollagens bestimmt, wurde hier als Maß für die Menge des enthaltenen Kollagens genutzt und gemessen. Hierbei wird das Hydroxyprolin zu einem Zwischenprodukt oxidiert, das durch eine Entwicklerlösung und Dimethylaminobenzaldehyd (DMAB) in ein Chromophor umgewandelt wird. Dessen Extinktion kann im Anschluss photometrisch bestimmt werden.

Um freies Hydroxyprolin zu gewinnen wurden die vorher auf 10 ± 5 mg abgewogenen Aortengewebeproben mit 100 µl *Aqua dest.* versetzt und mit einem Tissue Lyser (Qiagen) homogenisiert. Das erhaltene Lysat wurde in neue Eppendorfgefäße übertragen und jeweils 100 µl konzentrierte NaOH-Lösung hinzugegeben. Danach erfolgte eine Inkubation der Röhrchen auf einem Thermomixer bei 100°C. Anschließend wurden die Röhrchen auf Eis gekühlt und 100 µl konzentrierte HCl-Lösung hinzugegeben. Nach kurzem Vortexen wurden die Röhrchen bei 10.000 x g zentrifugiert. Der mitgeführte Kollagen-I-Standard wurde wie die Gewebeproben mit NaOH- und HCl-Lösung behandelt. Es wurden jeweils 5 µl des erhaltenen Lysates und die Standardreihe (10, 8, 6, 4, 2, 0 µl) als Duplikate auf die Wells einer 96-Well-Platte aufgetragen. Die Platte wurde anschließend bei 65°C in einem Hybridisierungsofen inkubiert bis das aufgetragene Lysat verdampft ist. Danach erfolgte die Zugabe von 100 µl der Oxidationsreaktionslösung. Die Platte wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde 50 µl der Entwicklerlösung hinzugefügt und die Platte bei 37°C für fünf Minuten inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 50 µl des DMAB-Konzentrates und eine Versiegelung der Platte mit einer

Folie. Nach einer kurzen Durchmischung wurde die Platte für 45 Minuten bei 65°C in einem Hybridisierungssofen inkubiert. Schließlich wurde die Extinktion der Proben bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen und deren Kollagen-Konzentration anhand der Standardkurve berechnet.

4.9 Proteinextraktion

Zur Probenvorbereitung vor Verfahren wie der Elektrophorese und dem Western Blot müssen die Aortenproben einer Proteinextraktion unterzogen werden. Das Ziel ist es durch Homogenisierung und Lysierung des Gewebes eine große Menge an Protein zu gewinnen, das im Anschluss analysiert werden kann. Zum Schutz der Proteine wurde hier zusätzlich ein Protease-/Phosphatase-Inhibitor hinzugegeben, der über eine Hemmung der Proteinspaltung einen Abbau der Proteine verhindern kann.

Für die Proteinextraktion wurde das Aortengewebe auf 75 ± 25 mg abgewogen und mit 200 µl RIPA-Puffer versetzt, dem zusätzlich ein Protease-/Phosphatase-Inhibitor zugegeben wurde. Anschließend erfolgte die Homogenisierung des Gewebes in einem Tissue Lyser (Qiagen). Daraufgehend wurden zu dem Lysat weitere 200 µl RIPA-Puffer hinzugefügt und gründlich gemischt. Die Röhrchen wurden für zehn Minuten bei $10.000 \times g$ zentrifugiert und der Überstand in neue Eppendorfgefäße pipettiert. Um Gewebeüberreste und anderes überflüssiges Material zu entfernen wurde die Zentrifugation mit Abpipettieren des Überstandes für ein weiteres Mal wiederholt.

4.10 Proteinkonzentrationsbestimmung

Bei der Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgt die Messung der im untersuchten Lysat befindlichen Proteinmenge. Anhand der Proteinmenge können im Anschluss Lysate hergestellt werden, deren Proteinkonzentration gleich ist. Dadurch wird eine Vergleichbarkeit der Werte untereinander geschaffen.

Für die Proteinbestimmung wurden 10 µl des bei der Proteinextraktion erhaltenen Lysates auf eine 96-Well-Platte pipettiert, der bereits 90 µl RIPA-Puffer pro Well

hinzugegeben wurde. Anschließend erfolgte die Proteinbestimmung gemäß dem Bicinchoninsäure-Assay (Smith *et al.* 1985). Nachfolgend wurden die Lysate auf 1 µg/µl mit RIPA-Puffer normalisiert.

4.11 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Die SDS-PAGE dient der elektrophoretischen Auftrennung der im Lysat befindlichen Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Dafür wurden die Lysate mit Probenpuffer, bestehend aus Lämmli und β-Mercaptoethanol versetzt, um die Proteine zu denaturieren. Das dem Probenpuffer und später hinzugegebenen Laufpuffer enthaltene SDS bewirkte durch seine negative Ladung ein Gleichsetzen der Eigenladung der Proteine. Dadurch konnten die Proteine anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden.

Für die SDS-PAGE wurden zur Doppelbestimmung zwei 4%-ige Sammelgele und 12%-ige Trenngele nach dem in Tabelle 1 aufgeführten Rezept hergestellt.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels.

Bestandteil	Sammelgel	Trenngel
Aqua dest.	7,8 ml	6,6 ml
Acrylamid/BIS	2 ml	8 ml
Sammel-/Trenngelpuffer	3,3 ml	5 ml
APS	90 µl	200 µl
TEMED	40 µl	20

Die Flüssigkeit wurde nach Zugabe des APS und TEMED unverzüglich zwischen die Platten gegossen, um einem vorzeitigen Polymerisieren der Flüssigkeit zuvorzukommen. Die Trenngelflüssigkeit wurde mit Isopropanol überschichtet, um das entstehende Trenngel zu glätten und Luftblasen auszuspülen. Nach dem Polymerisieren des Trenngels wurde das Isopropanol abgegossen und die Platten gründlich mit Leitungswasser von Isopropanolrückständen befreit. Nach dem Trocknen der Platten und Entfernen übriger Wassertropfen wurde die Sammelgelflüssigkeit aufgetragen. Danach erfolgte das Einbringen eines 20er-Kammes, um die Geltaschen zu bilden. Das Gel wurde über Nacht bei Raumtemperatur in Laufgelpuffer gelagert.

Die untersuchten Lysate wurden zuerst im Verhältnis 1:3 mit Probenpuffer versetzt, der seinerseits aus vierfachem Lämmli und β -Mercaptoethanol bestand (Verhältnis 10:1). Danach wurden diese bei 95°C für fünf Minuten inkubiert. Dadurch kam es zur Denaturierung der Proteine. Nun wurden die Geltaschen mit Laufpuffer gespült und von überflüssigen Gelresten befreit. Anschließend wurden die Lysate und der Marker in die Geltaschen gefüllt. Um einem sogenannten Smile-Effekt entgegenzuwirken wurden die beiden äußeren Taschen nicht mit Lysat oder Marker, sondern mit reinem Probenpuffer befüllt. Nach dem Einfüllen wurde kontrolliert, ob sich ausreichend Laufpuffer zwischen den Platten befand. Anschließend wurde der Deckel mit der entsprechenden Polung auf die Apparatur gesetzt und die Elektrophorese bei konstant 35 mA gestartet. Sobald die Proteinbanden das untere Ende des Gels erreichten, wurde die Elektrophorese beendet.

4.12 Western Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren, bei dem die vorher durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) übertragen wurden. Durch ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel angelegtes elektrisches Feld wandern die negativ geladenen Proteine in Richtung der positiv geladenen Anode und werden so auf die unter dem Gel befindliche PVDF-Membran übertragen.

Zuerst wurde die PVDF-Membran für zwei Minuten in Methanol aktiviert und anschließend in Bjerrum-Puffer eingelegt, um ein Austrocknen derselben zu verhindern. Anschließend wurden sowohl die Whatman-Paper als auch das Trenngel, das zuvor vom Sammelgel getrennt wurde, in den Bjerrum-Puffer eingelegt. Nun wurden das Trenngel und die PVDF-Membran zwischen jeweils vier Whatman-Paper gelegt. Nach Aufsetzen des Deckels wurden die Schrauben mittels Wasserwaage gleichmäßig angezogen, sodass sich ein gleichmäßiger Druck auf den Blotsandwiches befand. Nun wurden die Elektroden angeschlossen und der Blot bei konstant 200 mA für 70 Minuten gestartet. Zur Kühlung wurden zwei Kühlakkus auf die Blot-Apparatur aufgebracht.

4.13 Immundetektion

Durch die Immundetektion können Proteine, die auf die PVDF-Membran übertragen wurden, identifiziert und schließlich quantifiziert werden.

Nach dem Blotting wurde die Membran in Ponceau-Lösung eingelegt, um die übertragenen Proteinbanden sichtbar zu machen. Um sicherzustellen, dass alle Proteine aus dem Gel auf die PVDF-Membran übertragen wurden, wurde eine Coomassie-Färbung des Gels vorgenommen, die in der Lage ist nicht übertragene Proteinbanden darzustellen. Die angefärbte Membran wurde zur besseren Handhabbarkeit an einer geeigneten Stelle geschnitten, beschriftet und anschließend mit *Aqua dest.* und TBS-T-Lösung entfärbt. Nachfolgend wurden die Membranen in 5%-iger Milchpulverlösung (gelöst in *Aqua dest.*) für 90 Minuten geblockt, um unspezifische Bindungsstellen abzuschirmen und eine spezifische Antikörperbindung zu ermöglichen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C. Anschließend wurden die Membranen einmal in TBS-T- und zweimal in TBS-Lösung für jeweils zehn Minuten gewaschen. Es erfolgte die Zugabe des Sekundärantikörpers für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Tabelle 2: Antikörper mit Verdünnung.

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Anti-Biglycan	1:2000	Anti-Mouse	1:10000
Anti-GAPDH	1:4000		

Nach Wiederholung der oben beschriebenen Waschschrte mit TBST- und TBS-Lösung wurden die Membranen mit Luminol-Enhancer-Solution und Peroxid-Solution beschichtet, um eine Detektion der Lumineszenz zu ermöglichen. Diese wurde mit dem Fusion FX7 von Vilber detektiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm ImageJ.

4.14 Einbetten in Paraffin

Die Paraffinisierung von Gewebeproben dient der Fixierung, Entwässerung und Vorbereitung des Gewebes, um ein nachfolgendes Schneiden zu erleichtern.

Bei der Präparation der Aorta wurden Gewebestücke für die Histologie von der konvexen und konkaven Seite entnommen und für mindestens 48 Stunden in Formalin fixiert. Anschließend erfolgte die Infiltration der Gewebestücke mit einem Gewebeeinfiltrationsautomaten gemäß dem Protokoll der Tabelle.

Tabelle 3: Protokoll des Gewebeeinfiltrationsautomaten.

Lösung	Zeit [min]
Ethanol 30 %	120
Ethanol 50 %	120
Ethanol 70 %	120
Ethanol 80 %	120
Ethanol 96 %	120
Isopropanol	120
Isopropanol	120
Essigsäure-N-Buthylester	120
Essigsäure-N-Buthylester	120
Paraffin	120
Paraffin	120
Paraffin	120

Nun erfolgte die Einbettung in Paraffin, indem flüssiges Paraffin in die das Gewebestück enthaltende Kassette eingefüllt wurde. Zum Aushärten wurden die Kassetten mit Paraffin mit einer Kälteplatte behandelt. Die Paraffinblöcke wurden im Anschluss mittels Mikrotom geschnitten und zum Glätten in ein Streckbad überführt. Zum Trocknen der Schnitte wurde eine Wärmeplatte verwendet.

4.15 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung ist ein Färbeverfahren, bei dem die strukturellen Eigenschaften eines Präparats übersichtlich dargestellt werden können.

Die zuvor paraffinisierten und getrockneten Proben wurden zweimal für je zehn Minuten zu einer Küvette mit Xylol hinzugegeben, um die Proben zu deparaffinisieren. Darauffolgend wurden die Präparate mit Isopropanol und einer absteigenden Alkoholreihe (100, 90, 80, 70 %) behandelt, um die Proben zu

hydrieren. Nach kurzem Spülen der Proben mit *Aqua dest.* für zwei Minuten wurden diese für zehn Minuten in Hämalaun-Lösung gestellt. Anschließend wurden die Präparate für 15 Minuten zum Bläuen mit laufendem Leitungswasser abgespült. Nach kurzem Eintauchen in *Aqua dest.* wurden die Präparate für 25 Sekunden in 1%-ige Eosinlösung gegeben, die mit einem Tropfen Eisessigsäure versetzt war. Nach kurzem Eintauchen in Leitungswasser und *Aqua dest.* wurden die Präparate zur Dehydrierung einer aufsteigenden Alkoholreihe (70, 96 %) zugeführt, um schließlich für fünf Minuten in Isopropanol gestellt zu werden. Nach dem Trocknen der Präparate wurden diese mit Leica CV Mount und Deckgläschen eingedeckt. Das Bindegewebe stellte sich im fertigen Präparat rot, die Zellkerne schwarzblau und das Zytoplasma rosa dar.

4.16 Alcianblau-PAS-Färbung

Die Alcianblau-PAS-Färbung dient dem Sichtbarmachen der sauren und neutralen Mukopolysaccharide in einem Präparat. Hierbei färbt die Alcianblau-Lösung die sauren Mukopolysaccharide hellblau an, während bei der Reaktion der Präparate mit der Periodsäure und dem Schiffs-Reagenz die neutralen Mukopolysaccharide purpur gefärbt werden.

Die Proben wurden zweimal für je zehn Minuten mit Xylol behandelt. Danach wurden sie für je fünf Minuten zu Isopropanol und einer absteigenden Alkoholreihe (100, 90, 80, 70 %) hinzugegeben. Es erfolgte die Spülung für zwei Minuten in *Aqua dest.* Anschließend wurden die Präparate in Alcianblau-Lösung für fünf Minuten gefärbt. Die Präparate wurden für drei Minuten mit laufendem Leitungswasser gespült. Nach kurzem Eintauchen der Präparate in *Aqua dest.* wurden diese für zehn Minuten in Periodsäure gestellt. Danach wurde erneut mit laufendem Leitungswasser für drei Minuten und kurzem Eintauchen in *Aqua dest.* gespült. Anschließend wurden die Präparate für 15 Minuten mit Schiffs-Reagenz behandelt. Es erfolgte eine weitere Spülung mit laufendem Leitungswasser für drei Minuten und kurzem Eintauchen in *Aqua dest.* Zur Kernfärbung erfolgte die Zugabe zu einer Hämatoxylin-Lösung nach Gill für eine Minute. Die Proben wurden anschließend für drei Minuten bei laufendem Leitungswasser gebläut. Zum Entwässern wurde eine aufsteigende Ethanolreihe (70, zweimal 96 %) und Isopropanol für fünf Minuten verwendet. Nach dem

Trocknen der Präparate erfolgte das Eindecken. Im gefärbten Präparat stellten sich die sauren Mukopolysaccharide (Hyaluronsäure) hellblau, die Polysaccharide und neutralen Mukopolysaccharide (sGAG) purpur und die Zellkerne dunkelblau dar.

4.17 Von-Kossa-Färbung

Die *von-Kossa-Färbung* wurde durchgeführt, um Kalzifizierungen im Aortengewebe zu detektieren und quantifizieren. Hierbei werden durch Zugabe der Präparate zu einer Silbernitratlösung Kalzium- in Silbersalze umgewandelt. Durch eine Bestrahlung unter UV-Licht bildeten sich Silberniederschläge, die über eine Gegenfärbung mit Kernechtrot-Aluminiumsulfatlösung vom umliegenden Gewebe abgegrenzt werden konnten.

Die Präparate wurden zweimal für je zehn Minuten mit Xylol behandelt, um anschließend einer absteigenden Alkoholreihe (100, 96, 70, 50 %) zugeführt zu werden. Die Präparate wurden dreimal für je zwei Minuten in *Aqua dest.* gespült. Danach wurden die Präparate in 2%-iger Silbernitratlösung für 25 Minuten unter einer UV-Lampe belassen. Im Anschluss wurde dreimal für je zwei Minuten mit *Aqua dest.* gespült. Nun wurden die Präparate zu 5%-iger Natriumthiosulfatlösung für fünf Minuten hinzugegeben, um anschließend erneut dreimal für je zwei Minuten mit *Aqua dest.* gespült zu werden. Schließlich wurden die Präparate für fünf Minuten mit Kernechtrot-Aluminiumsulfatlösung gefärbt. Nach erneutem Spülen der Präparate mit laufendem Leitungswasser und zweimal zwei Minuten *Aqua dest.* wurden die Präparate zum Dehydrieren einer aufsteigenden Alkoholreihe für je drei Minuten zugeführt (70, 96, 100 %). Schließlich wurden die Präparate für fünf Minuten in Xylol gestellt. Das Eindecken der Präparate erfolgte nach ausreichender Trocknung. Nach der abgeschlossenen Färbung stellten sich die Kalzium-Salze schwarz bis braun, die Zellkerne rot und das Zytoplasma rosa dar.

4.18 Auswertung der Färbungen

4.18.1 HE-Färbung

Die Auswertung der HE-Färbung erfolgte mit dem Programm Panoramic Viewer. Es wurden sowohl die Intima- als auch die Mediadicke der einzelnen Präparate bestimmt.

4.18.2 Alcianblau-PAS-Färbung

Die Alcianblau-PAS-Färbung wurde mit dem Programm Panoramic Viewer ausgewertet. Anhand der Verteilung und größerer Zusammenlagerungen der Hyaluronsäure, die nicht dem üblichen Muster entsprechen (Clusterbildung) wurde ein Grading erstellt, nach dem die gefärbten Präparate ausgewertet wurden. Die hellblau gefärbten sauren Mukopolysaccharide (Hyaluronsäure) wurden dabei untersucht, die purpur dargestellten Polysaccharide und neutrale Mukopolysaccharide (sGAG) wurden nicht weiter beachtet. Sowohl für die Clusterbildung (siehe Tab. 4), als auch die Verteilung der Hyaluronsäure (siehe Tab. 5) wurden vier Grade festgelegt, die in den folgenden Tabellen dargestellt sind.

Tabelle 4: Alcianblau-PAS-Färbung. Grading der Clusterbildung.

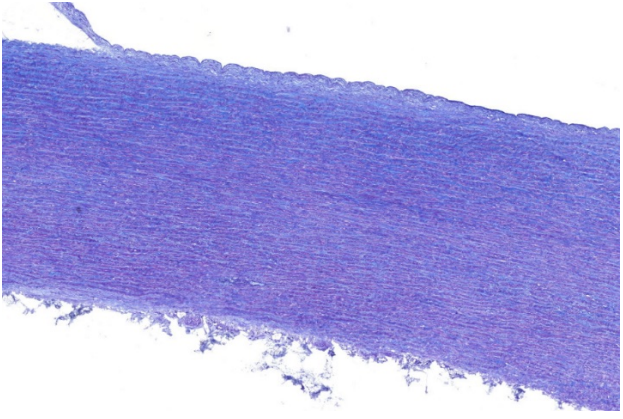
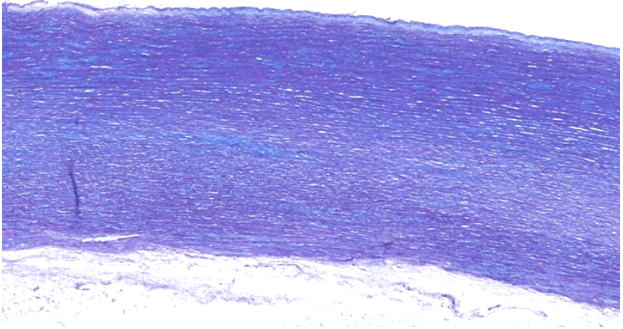
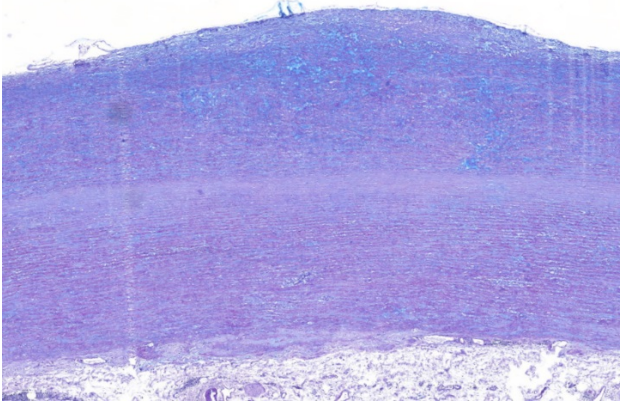
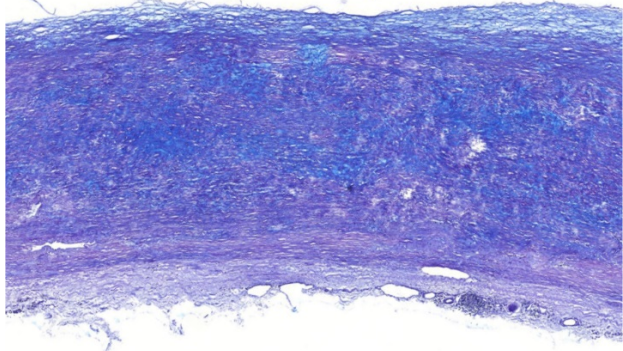
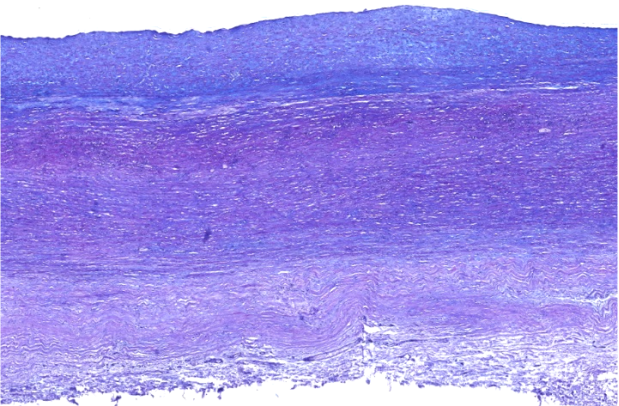
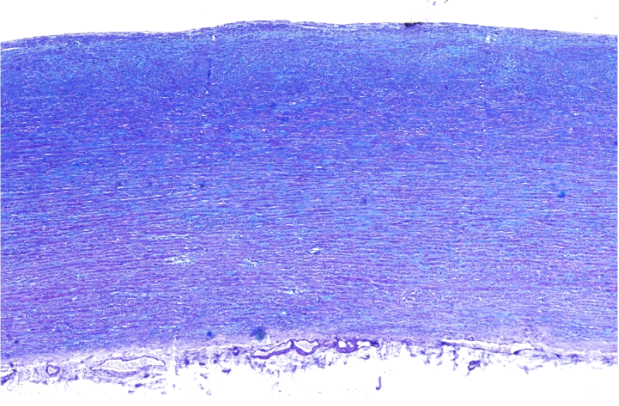
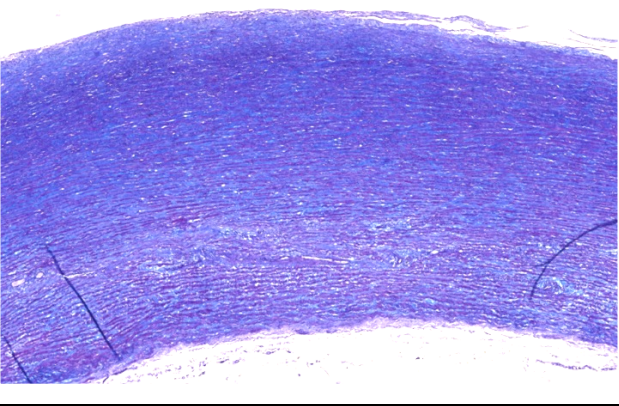
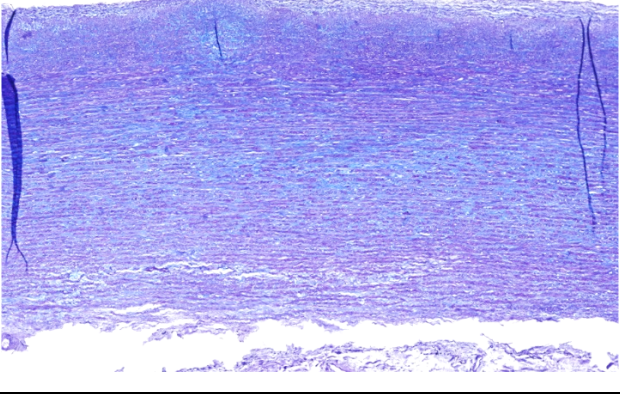
Grad der Clusterbildung	Exemplarisches Bild
1: keine Clusterbildung	 A histological section stained with Alcian blue and PAS. The tissue shows a uniform, dense blue staining throughout, with no visible clusters or irregularities in the staining pattern.
2: geringgradige Clusterbildung	 A histological section stained with Alcian blue and PAS. The tissue shows a uniform blue staining, but there are some small, faint, irregular areas of lighter staining, indicating the beginning of cluster formation.
3: mittelgradige Clusterbildung	 A histological section stained with Alcian blue and PAS. The tissue shows a uniform blue staining, but there are more pronounced, irregular areas of lighter staining, indicating medium-grade cluster formation.
4: hochgradige Clusterbildung	 A histological section stained with Alcian blue and PAS. The tissue shows a uniform blue staining, but there are very pronounced, irregular areas of lighter staining, indicating high-grade cluster formation.

Tabelle 5: Alcianblau-PAS-Färbung. Grading der Hyaluronsäure-Verteilung.

Verteilung	Exemplarisches Bild
1: <i>Intima >> Media</i>	
2: <i>Intima > Media</i>	
3: <i>Intima = Media</i>	
4: <i>Intima < Media</i>	

4.18.3 Von-Kossa-Färbung

Die Auswertung der *von-Kossa*-Färbung erfolgte mit dem Programm ImageJ. Es wurde der prozentuale Anteil der schwarz gefärbten Kalzifizierungen am Gesamtbild des Präparates bestimmt.

4.19 Statistik

Die Auswertung und statistischen Analysen der ermittelten Daten erfolgte mit dem Programm SPSS. Die Daten wurden auf Normalverteilung getestet. Anschließend erfolgte die Darstellung der deskriptiven Daten mit Mittelwert und Standardfehler oder Standardabweichung. Kategoriale Daten wurden als Anzahl (n) und Prozent (%) dargestellt. Es wurde der χ^2 - oder Fishers-exact-Test durchgeführt. Bei kontinuierlichen Variablen wurde die statistische Signifikanz mittels ANOVA oder dem t-Test (für abhängige und unabhängige Variablen) ermittelt. Das Signifikanzniveau wurde bei 5 % angenommen.

5 Ergebnisse

5.1 Biomechanisches Stretching und zugehörige EZM-Bestandteile

Patienten mit bikuspidaler Aortenklappe weisen ein vermehrtes Auftreten von Aortenaneurysmen und akuten Aortendissektionen, bereits in jüngeren Jahren, auf (Larson und Edwards 1984; Della Corte *et al.* 2007; Jackson *et al.* 2011; Masri *et al.* 2017). Vor dem Hintergrund der hohen Mortalität der Aortendissektion zeigt sich eine Notwendigkeit Parameter zu erforschen, die durchmesserunabhängig das Dissektionsrisiko evaluieren können (Michelen *et al.* 2008). Dabei wurden insbesondere die biomechanischen Eigenschaften der Aorta als mögliche Parameter diskutiert (Cheheltani *et al.* 2014). Das biomechanische Stretching diente daher dem Sichtbarmachen der Reißfestigkeit und des Reißverhaltens des Aortengewebes unter mechanischer Belastung.

Samila und Carter beschrieben bereits den Einfluss der EZM-Bestandteile Elastin und Kollagen auf das Dehnungsverhalten von menschlichen Karotiden (Samila und Carter 1981). Ebenfalls wurde die Rolle der Glykosaminoglykane bei Aortendissektionen diskutiert. Diese könnten über eine vermehrte Akkumulation in der Aortenwand zu einer *Donnan-Schwellung* und folglich einem Einriss der Aortenwand führen (Roccabianca *et al.* 2014b). Besonders die Bestandteile der EZM standen aufgrund dieser Erkenntnisse im Fokus der vorliegenden Arbeit. Dafür wurden die Aortenproben neben dem Stretching weiteren Versuchen unterzogen, um die EZM-Bestandteile zu quantifizieren und mit dem biomechanischen Verhalten der Aortenwand korrelieren zu können.

Es wurden insgesamt 35 Patientenproben untersucht. 16 Patienten wiesen dabei eine trikuspidale Aortenklappe und 19 Patienten eine bikuspidale Aortenklappe auf. Die Proben wurden in verschiedene Gruppen unterteilt: Es wurden die konkave (BAV-K, TAV-K) und die konvexe Seite (BAV-V, TAV-V) der Aortenproben getestet.

Die untersuchte Patientenpopulation wurde auf Unterschiede in den in Tabelle 6 dargestellten Parametern getestet. Der Chi-Quadrat-Test zeigte dabei eine

signifikante höhere Anzahl von männlichen Probanden in der BAV- gegenüber der TAV-Population. Weiterhin zeigte sich eine signifikant erhöhte Prävalenz der Aortenklappenstenose in der BAV-Gruppe und eine signifikant erhöhte Prävalenz der Aortenklappeninsuffizienz bei der TAV-Gruppe. Die anderen Parameter wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.

Tabelle 6: Patientenpopulation der gestretchten Patientenproben. Dargestellt sind die Patientenanzahl (n) und die Verteilungen des Geschlechts, des Alters, des Raucherstatus, von Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie (aHT), koronarer Herzkrankheit (KHK), des Durchmessers der Aorta ascendens (Aorta asc.), der Aortenklappenstenose, Aortenklappeninsuffizienz und des kombinierten Klappenvitiums (Aortenklappenstenose + -insuffizienz). Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) aufgeführt. Die Parameter galten bei einem p-Wert $\leq 0,05$ als signifikant.

Charakteristikum	BAV	TAV	p-Wert
Patientenanzahl (n)	19	16	
Geschlecht (männlich; n, %)	19 (100)	12 (75)	0,021
Alter (Jahre \pm SEM)	59,4 \pm 2,5	66,1 \pm 2,6	0,069
Rauchen (n, %)	6 (32)	3 (19)	0,387
Diabetes (n, %)	2 (11)	1 (6)	0,653
aHT (n, %)	16 (84)	12 (75)	0,497
KHK (n, %)	6 (32)	1 (6)	0,062
Durchmesser der Aorta asc. (mm \pm SEM)	51,6 \pm 1,0	53,9 \pm 4,2	0,591
Aortenklappenstenose	10 (53)	0 (0)	< 0,001
Aortenklappeninsuffizienz	5 (26)	14 (88)	< 0,001
Kombiniertes Klappenvitium	2 (11)	0 (0)	0,192

Die Aortenproben wurden einem biomechanischen Stretching unterzogen. Weiterhin wurden die EZM-Bestandteile Hyaluronsäure, GAG, Elastin, Kollagen und das Proteoglycan Biglycan quantifiziert.

Zur besseren Vergleichbarkeit der konvexen und konkaven Seiten untereinander wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt, um signifikante Unterschiede innerhalb einer Untergruppe darzustellen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 abgebildet.

Tabelle 7: Unterschiede des Elastizitätsmoduls in den konvexen und konkaven Seiten. Dargestellt sind die Elastizitätsmodule der konvexen und konkaven Seiten in MPa. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) aufgeführt. Die Parameter galten bei einem p-Wert $\leq 0,05$ als signifikant.

Gruppe	Konvexe Seite (V)	Konkave Seite (K)	p-Wert
BAV-1	3,49 \pm 0,43	5,66 \pm 0,92	0,033
BAV-2	12,17 \pm 0,23	9,91 \pm 3	0,563
TAV	4,68 \pm 0,59	3,71 \pm 0,77	0,319
BAV \geq 55 mm	4,03 \pm 0,85	4,81 \pm 1,68	0,567
BAV < 55 mm	5,94 \pm 1,47	6,52 \pm 1,12	0,75
TAV \geq 55 mm	5,93 \pm 0,77	3,72 \pm 1,9	0,495
TAV < 55 mm	3,68 \pm 0,63	2,9 \pm 0,4	0,422

Allein die BAV-1-Gruppe wies einen signifikant erhöhten Unterschied der konkaven gegenüber den konvexen Seiten auf (5,66 MPa \pm 0,92 vs. 3,49 MPa \pm 0,43; p = 0,033).

Bei der Untersuchung der mechanischen Eigenschaften konnten einige wenige Aortenproben trotz Stretching nicht zum Reißen gebracht werden. Diese Aortenproben sind in Tabelle 8 aufgeführt. Da dies nur eine kleine Stichprobe umfasst und von einigen Proben kein weiteres Material zur Untersuchung der EZM-Bestandteile zur Verfügung stand, werden hier nur die entsprechenden Elastizitätsmodule aufgeführt.

Tabelle 8: Zusammenfassung der nicht gerissenen Aortenproben. Dargestellt sind die nicht gerissenen Aortenproben mit Fallnummer und Elastizitätsmodul in MPa. Unter den nicht gerissenen Proben befinden sich sowohl BAV- als auch TAV-Proben. Es sind sowohl die konvexen (V), als auch die konkaven Seiten (K) in der Zusammenfassung aufgeführt. In der untersten Zeile ist der Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) abgebildet.

Fallnummer	Elastizitätsmodul [MPa]
1 K BAV	5,95
2 V TAV	5,32
3 K BAV	12,56
4 K BAV	9,17
4 V BAV	6,26
Median	6,26
Mittelwert \pm SD	7,85 \pm 3,02

Zur Veranschaulichung der Charakteristika dieser Patientenkohorte sind in Tabelle 9 die relevanten Parameter dargestellt.

Tabelle 9: Patientenpopulation der nicht gerissenen Aortenproben. Dargestellt sind die Angaben zum Klappentyp, Geschlecht (m: männlich; w: weiblich), Alter, Raucherstatus, Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie (aHT), koronarer Herzkrankheit (KHK), Durchmesser der Aorta ascendens (Aorta asc.), Aortenklappenstenose, Aortenklappeninsuffizienz und kombinierten Klappenvitium (Aortenklappenstenose + -insuffizienz).

Charakteristikum	1	2	3	4
Klappentyp	BAV	TAV	BAV	BAV
Geschlecht	m	m	m	m
Alter (Jahre)	46	56	69	54
Rauchen	Ja	Nein	Nein	Nein
Diabetes	Nein	Nein	Nein	Nein
aHT	Ja	Ja	Ja	Ja
KHK	Nein	Nein	Nein	Nein
Durchmesser der Aorta asc. (mm)	45	41	51	57
Aortenklappenstenose	Ja	Nein	Nein	Nein
Aortenklappeninsuffizienz	Nein	Ja	Ja	Ja
Kombiniertes Klappenvitium	Nein	Nein	Nein	Nein

5.1.1 Einteilung nach Elastizitätsmodul

Die BAV-Proben ließen sich anhand des Elastizitätsmoduls in zwei Untergruppen aufteilen. Die Patientencharakteristika dieser Untergruppen sind in Tabelle 10 dargestellt. Mittels ANOVA wurden die Parameter auf Unabhängigkeit getestet. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den BAV-1-, BAV-2- und TAV-Gruppen bei den Parametern Geschlecht, Diabetes mellitus, KHK, Aortenklappenstenose und -insuffizienz. Die weiteren Parameter wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.

Tabelle 10: Patientenpopulation der BAV- und TAV-Gruppen nach Elastizitätsmodul sortiert. Dargestellt sind die Patientenanzahl (n) und die Verteilungen des Geschlechts, des Alters, des Raucherstatus, von Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie (aHT), koronarer Herzkrankheit (KHK), des Durchmessers der Aorta ascendens (Aorta asc.) der Aortenklappenstenose, Aortenklappeninsuffizienz und des kombinierten Klappenvitiums (Aortenklappenstenose + -insuffizienz). Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) aufgeführt. Die Parameter galten bei einem p-Wert $\leq 0,05$ als signifikant.

Charakteristikum	BAV-1	BAV-2	TAV	p-Wert
Patientenanzahl	15	4	16	
Geschlecht (männlich; n, %)	15 (100)	4 (100)	12 (75)	0,07
Alter (Jahre \pm SEM)	58,47 \pm 3,04	62,75 \pm 2,14	66,1 \pm 2,6	0,152
Rauchen (n, %)	4 (27)	2 (50)	3 (19)	0,462
Diabetes (n, %)	0 (0)	2 (50)	1 (6)	0,004
aHT (n, %)	12 (80)	4 (100)	12 (75)	0,559
KHK (n, %)	3 (20)	3 (75)	1 (6)	0,006
Durchmesser der Aorta asc. (mm \pm SEM)	52,33 \pm 1,17	48,75 \pm 1,44	53,9 \pm 4,2	0,714
Aortenklappenstenose	8 (53)	2 (50)	0 (0)	0,001
Aortenklappeninsuffizienz	4 (27)	1 (25)	14 (88)	0,001
Kombiniertes Klappenvitium	1 (6,7)	1 (25)	0 (0)	0,163

Die Unterteilung in eine BAV-1- und BAV-2-Gruppe erfolgte nach Analyse der Reißfestigkeit in der *tensile stage* aufgrund der auffällig stark erhöhten Elastizitätsmodule. Die Ergebnisse der Untergruppen sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Zusammenfassung der Elastizitätsmodule der Untergruppen. Dargestellt sind die Elastizitätsmodule der konvexen und konkaven Seiten der BAV-1-, BAV-2- und TAV-Gruppe in MPa. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) aufgeführt.

Abschnitt	BAV-1	BAV-2	TAV
Konvex (V)	3,46 \pm 0,35	12,25 \pm 0,42	4,34 \pm 0,51
Konkav (K)	5,66 \pm 0,92	9,9 \pm 3	3,71 \pm 0,77

Die BAV-2-Gruppe definierte sich durch signifikant erhöhte Elastizitätsmodule der konvexen Seiten (V) gegenüber der BAV-1-Gruppe (12,25 MPa \pm 0,42 MPa vs. 3,46 MPa \pm 0,35 MPa; $p < 0,001$) sowie der TAV-Gruppe (12,25 MPa \pm 0,42 MPa vs. 4,34 MPa \pm 0,51 MPa; $p < 0,001$). Weiterhin zeigte sich ein deutlich erhöhtes Elastizitätsmodul bei den konkaven Seiten der BAV-2- gegenüber der TAV- Gruppe (9,9 MPa \pm 3 MPa vs. 3,71 MPa \pm 0,77 MPa). Die Werte der konkaven Seiten der BAV-1- und BAV-2-Gruppe zeigten ebenfalls Unterschiede auf (5,66 MPa \pm 0,92 MPa vs. 9,9 MPa \pm 3 MPa). Da die BAV-2-Gruppe eine geringe Stichprobengröße bei der konkaven Seite umfasste ($n=2$) wurde hier von einem statistischen Signifikanztest abgesehen. Die BAV-1-Gruppe zeigte höhere E-Module bei der konkaven Seite (5,66 MPa \pm 0,92 MPa vs. 3,71 MPa \pm 0,77 MPa; $p = 0,128$) und niedrigere Werte bei der konvexen Seite (3,46 MPa \pm 0,35 MPa vs. 4,34 MPa \pm 0,51 MPa; $p = 0,171$) gegenüber der TAV-Gruppe. Diese Ergebnisse zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied auf.

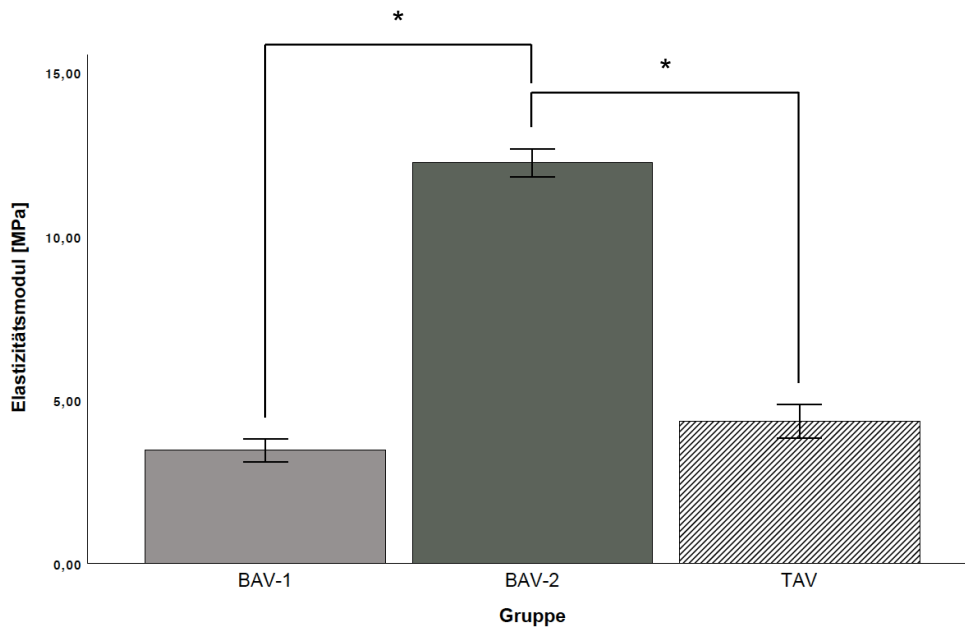


Abbildung 9: Darstellung der Elastizitätsmodule. Abgebildet sind die Elastizitätsmodule der konvexen Seiten der BAV-1-, BAV-2- und TAV-Gruppe als Mittelwert \pm SEM in MPa. Die mit einem Stern versehenen Klammern kennzeichnen einen statistisch signifikanten ($p \leq 0,05$) Unterschied zwischen den entsprechenden Gruppen.

Gemäß der Einteilung der BAV-Gruppe nach ihrem E-Modul konnten Unterschiede in der Zusammensetzung der EZM ausgemacht werden. Tabelle 12 stellt dabei die Ergebnisse der Kollagenbestimmung dar.

Tabelle 12: Zusammenfassung der Kollagenbestimmung der Untergruppen. Dargestellt sind die Werte der konkaven (K) und konvexen Seiten (V) der BAV-1-, BAV-2- und TAV-Gruppe in $\mu\text{g/g}$ (Aorta-)Nassgewebe als Mittelwert \pm SEM.

Abschnitt	BAV-1	BAV-2	TAV
Konvex (V)	894 \pm 60	1010 \pm 176	856 \pm 50
Konkav (K)	908 \pm 82	1181 \pm 172	867 \pm 63

So zeigten sich erhöhte Konzentrationen von Kollagen bei der BAV-2-Gruppe bei der konkaven und konvexen Seite. Dies war sowohl gegenüber der BAV-1-Gruppe (K: 1181 $\mu\text{g} \pm 172 \mu\text{g}$ vs. 908 $\mu\text{g} \pm 82 \mu\text{g}$; $p = 0,148$; V: 1010 $\mu\text{g} \pm 176 \mu\text{g}$ vs. 894 $\mu\text{g} \pm 60 \mu\text{g}$; $p = 0,442$) als auch der TAV-Gruppe zu beobachten (K: 1181 $\mu\text{g} \pm 172 \mu\text{g}$ vs. 867 $\mu\text{g} \pm 63 \mu\text{g}$; $p = 0,054$; V: 1010 $\mu\text{g} \pm 176 \mu\text{g}$ vs. 856 $\mu\text{g} \pm 50 \mu\text{g}$; $p = 0,255$). Wie in Abbildung 10 dargestellt, waren die Unterschiede jedoch nicht statistisch signifikant.

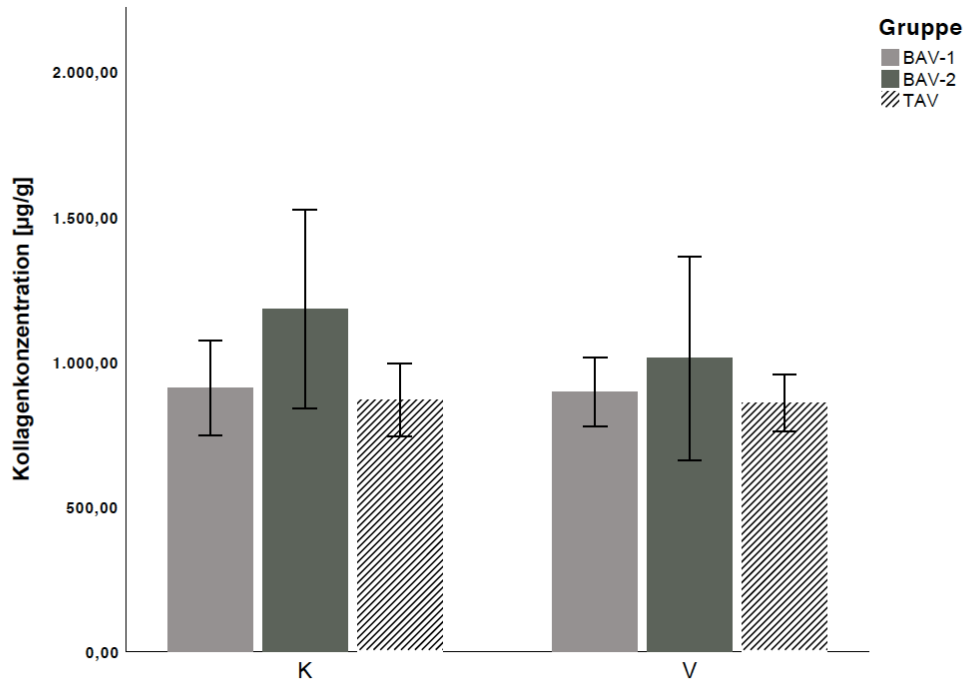


Abbildung 10: Darstellung der Kollagenkonzentration. Abgebildet sind die konkaven und konvexen Seiten der BAV-1-, BAV-2- und TAV-Gruppe als Mittelwert \pm SEM in $\mu\text{g/g}$ (Aorta-) Nassgewebe. Es ist eine erhöhte Konzentration von Kollagen in der BAV-2-Gruppe erkennbar.

Tabelle 13 stellt die Ergebnisse der Glykosaminoglykanbestimmung dar.

Tabelle 13: Zusammenfassung der GAG-Bestimmung der Untergruppen. Dargestellt sind die Werte der konkaven (K) und konvexen Seiten (V) der BAV-1-, BAV-2- und TAV-Gruppe in $\mu\text{g/g}$ (Aorta-)Nassgewebe als Mittelwert \pm SEM.

Abschnitt	BAV-1	BAV-2	TAV
Konvex (V)	873 \pm 67	686 \pm 143	1048 \pm 107
Konkav (K)	881 \pm 58	675 \pm 22	978 \pm 43

Bezüglich der Glykosaminoglykane wies die konvexe Seite der BAV-2-Gruppe die geringste Konzentration im Vergleich zur BAV-1- und TAV-Gruppe auf (686 $\mu\text{g} \pm 143 \mu\text{g}$ vs. 873 $\mu\text{g} \pm 67 \mu\text{g}$ vs. 1048 $\mu\text{g} \pm 107 \mu\text{g}$; $p = 0,297$). Hier zeigte sich keine statistische Signifikanz, dargestellt in Abbildung 11.

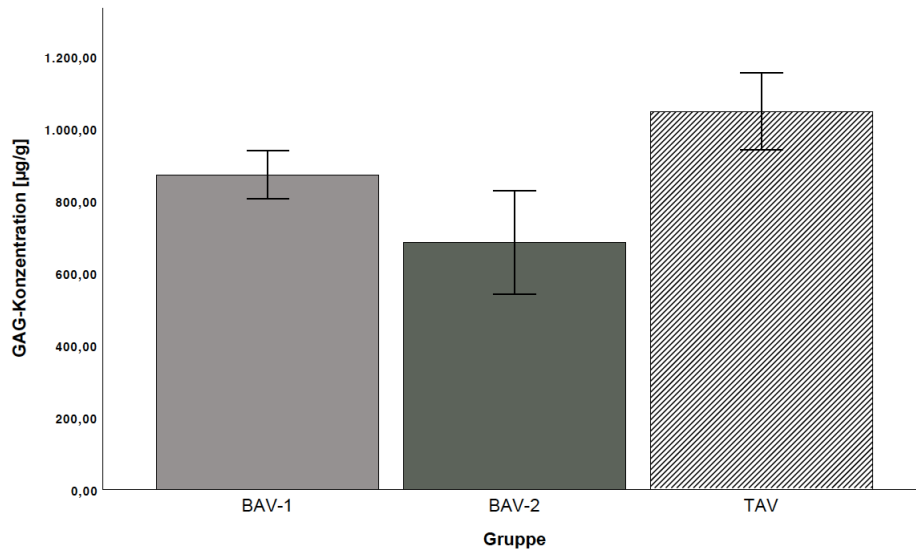


Abbildung 11: Darstellung der GAG-Konzentration. Abgebildet sind die GAG-Konzentrationen der konvexen Seiten der BAV-1-, BAV-2- und TAV Gruppe als Mittelwert \pm SEM in $\mu\text{g/g}$ (Aorta-) Nassgewebe. Es ist eine verminderte GAG-Konzentration in der BAV-2-Gruppe erkennbar.

5.1.2 Einteilung nach Aortendurchmesser

Um den Einfluss des Aortendurchmessers auf die Elastizitätsmodule und Bestandteile der EZM zu untersuchen, wurden die BAV- und TAV-Gruppe in jeweils zwei Untergruppen unterteilt. Bei BAV-Patienten wird die OP-Indikation im Normalfall ab einem Durchmesser ≥ 50 mm (Etz *et al.* 2012) bzw. ab ≥ 55 mm (Erbel *et al.* 2014) gestellt. Da TAV-Patienten ohne Risikofaktoren erst ab einem Durchmesser von ≥ 55 mm operiert werden (Erbel *et al.* 2014), wurde dieser Durchmesser zur besseren Vergleichbarkeit als Trenngröße der Untergruppen verwendet.

Die untersuchte Patientenpopulation ist in Tabelle 14 dargestellt. Die Parameter wurden mittels ANOVA auf Unabhängigkeit untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass sich die Gruppen im Alter, dem Aortendurchmesser, der KHK-Häufigkeit und Prävalenz der Aortenklappenstenose und -insuffizienz signifikant voneinander unterscheiden.

Tabelle 14: Patientenpopulation der BAV- und TAV-Gruppe nach Durchmesser sortiert. Dargestellt sind die Patientenanzahl und die Verteilungen des Geschlechts, des Alters, des Raucherstatus, von Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie (aHT), koronarer Herzkrankheit (KHK), des Durchmessers der Aorta ascendens (Aorta asc.) der Aortenklappenstenose, Aortenklappeninsuffizienz und des kombinierten Klappenvitiums (Aortenklappenstenose + -insuffizienz). Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) aufgeführt. Die Parameter galten bei einem p-Wert $\leq 0,05$ als signifikant.

Charakteristikum	BAV ≥ 55	BAV < 55	TAV ≥ 55	TAV < 55	p-Wert
Patientenanzahl (n)	6	13	6	9	
Geschlecht (männlich; n, %)	6 (100)	13 (100)	4 (67)	7 (78)	0,107
Alter (Jahre \pm SEM)	58,67 \pm 4,29	59,69 \pm 3,1	73,83 \pm 3,75	60,89 \pm 2,77	0,036
Rauchen (n, %)	0 (0)	6 (46)	1 (17)	2 (22)	0,173
Diabetes (n, %)	0 (0)	2 (15)	0 (0)	1 (11)	0,622
aHT (n, %)	4 (67)	12 (92)	4 (67)	8 (89)	0,392
KHK (n, %)	0 (0)	6 (46)	0 (0)	1 (11)	0,028
Durchmesser der Aorta asc. (mm \pm SEM)	56,83 \pm 0,98	49,15 \pm 0,73	68,67 \pm 6,18	44,11 \pm 2,12	< 0,001
Aortenklappenstenose	3 (50)	7 (54)	0 (0)	0 (0)	0,007
Aortenklappeninsuffizienz	2 (33)	3 (23)	5 (83)	8 (89)	0,003
Kombiniertes Klappenvitium	0 (0)	2 (15)	0 (0)	0 (0)	0,488

Unterteilt man die BAV- und TAV-Gruppe anhand ihres Durchmessers (≥ 55 mm; < 55 mm) stellen sich die Elastizitätsmodule der einzelnen Untergruppen wie in Tabelle 15 dar.

Tabelle 15: Zusammenfassung des Elastizitätsmoduls nach Aortendurchmesser sortiert. Dargestellt sind die Elastizitätsmodule der konvexen und konkaven Seiten der BAV ≥ 55 -, BAV < 55 -, TAV ≥ 55 - und TAV < 55 -Gruppe in MPa. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) aufgeführt.

Abschnitt	BAV ≥ 55	BAV < 55	TAV ≥ 55	TAV < 55
Konvex (V)	4,03 \pm 0,69	5,9 \pm 1,25	4,12 \pm 0,88	4,2 \pm 0,67
Konkav (K)	4,81 \pm 1,68	6,52 \pm 1,12	3,72 \pm 1,9	2,9 \pm 0,40

Es konnte gezeigt werden, dass sich das E-Modul der Gruppen untereinander nicht signifikant unterscheidet. Somit war für die BAV-Gruppe mit einem Durchmesser ≥ 55 mm gegenüber der BAV-Gruppe mit einem Durchmesser von < 55 mm kein signifikanter Unterschied erkennbar (K: 4,81 MPa \pm 1,68 MPa vs. 6,52 MPa \pm 1,12 MPa; $p = 0,404$; V: 4,03 MPa \pm 0,69 MPa vs. 5,9 MPa \pm 1,25 MPa; $p = 0,206$). Bei den Gruppen TAV ≥ 55 mm und TAV < 55 mm war ebenfalls kein signifikanter Unterschied erkennbar (K: 3,72 MPa \pm 1,9 MPa vs. 2,9 MPa \pm 0,40 MPa; $p = 0,71$; V: 4,12 MPa \pm 0,88 MPa vs. 4,2 MPa \pm 0,67 MPa; $p = 0,947$). Die konvexen Seiten der BAV-Gruppe < 55 mm zeigte ein erhöhtes E-Modul gegenüber der TAV-Gruppe < 55 mm. Das Ergebnis zeigte keine statistische Signifikanz. Lediglich beim Vergleich des E-Modul der Gruppen BAV-K < 55 mm gegenüber TAV-K < 55 mm konnten signifikant erhöhte Mittelwerte bei der BAV-Gruppe festgestellt werden (6,52 MPa \pm 1,12 MPa vs. 2,9 MPa \pm 0,40 MPa; $p = 0,03$), dargestellt in Abbildung 12.

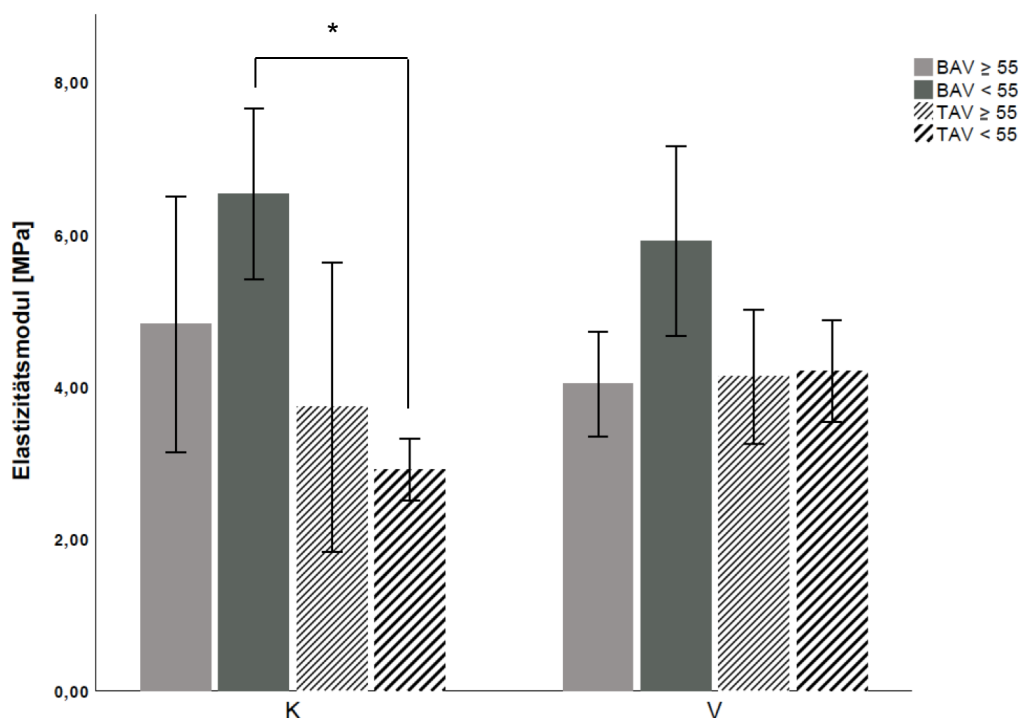


Abbildung 12: Darstellung der Elastizitätsmodule. Abgebildet sind die E-Module der konkaven und konvexen Seiten der BAV- und TAV-Gruppe nach Durchmesser sortiert. Das E-Modul ist mit Mittelwert \pm SEM in MPa dargestellt. Die mit einem Stern versehenen Klammern kennzeichnen einen statistisch signifikanten ($p \leq 0,05$) Unterschied zwischen den entsprechenden Gruppen.

Die Ergebnisse der Hyaluronsäurebestimmung der nach Aortendurchmesser sortierten Gruppen sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Zusammenfassung der Hyaluronsäurebestimmung nach Aortendurchmesser sortiert. Dargestellt sind die Werte der konkaven (K) und konvexen Seiten (V) der BAV ≥ 55 -, BAV < 55 -, TAV ≥ 55 - und TAV < 55 -Gruppe in $\mu\text{g/g}$ (Aorta-)Nassgewebe als Mittelwert \pm SEM.

Abschnitt	BAV ≥ 55	BAV < 55	TAV ≥ 55	TAV < 55
Konvex (V)	77,71 \pm 5,84	52,34 \pm 6,02	35,31 \pm 9,21	82,8 \pm 17,12
Konkav (K)	64,84 \pm 6,18	78,21 \pm 9,78	68,91 \pm 23,18	80,12 \pm 12,3

Die Konzentration der Hyaluronsäure war in der konvexen Seite der BAV-Gruppe ≥ 55 mm signifikant gegenüber der BAV-Gruppe < 55 mm erhöht (77,71 $\mu\text{g} \pm 5,84$ μg vs. 52,34 $\mu\text{g} \pm 6,02$ μg ; $p = 0,039$). Bei der konvexen Seite der TAV-Gruppe ≥ 55 mm gegenüber der TAV-Gruppe < 55 mm konnte eine signifikant verminderte Hyaluronsäurekonzentration festgestellt werden (35,31 $\mu\text{g} \pm 9,21$ μg vs. 82,8 $\mu\text{g} \pm 17,12$ μg ; $p = 0,042$).

Wie in Abbildung 13 dargestellt zeigte der Vergleich der Gruppen BAV ≥ 55 mm und TAV ≥ 55 mm zeigte dabei einen signifikant erhöhten Wert bei der BAV-Gruppe ($77,71 \mu\text{g} \pm 5,84 \mu\text{g}$ vs. $35,31 \mu\text{g} \pm 9,21 \mu\text{g}$; $p = 0,009$). Die TAV-Gruppe < 55 mm zeigte zwar erhöhte Werte an Hyaluronsäure gegenüber der BAV-Gruppe < 55 mm ($82,8 \mu\text{g} \pm 17,12 \mu\text{g}$ vs. $52,34 \mu\text{g} \pm 6,02 \mu\text{g}$; $p = 0,143$), diese waren jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Die konkaven Seiten der verschiedenen Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede.

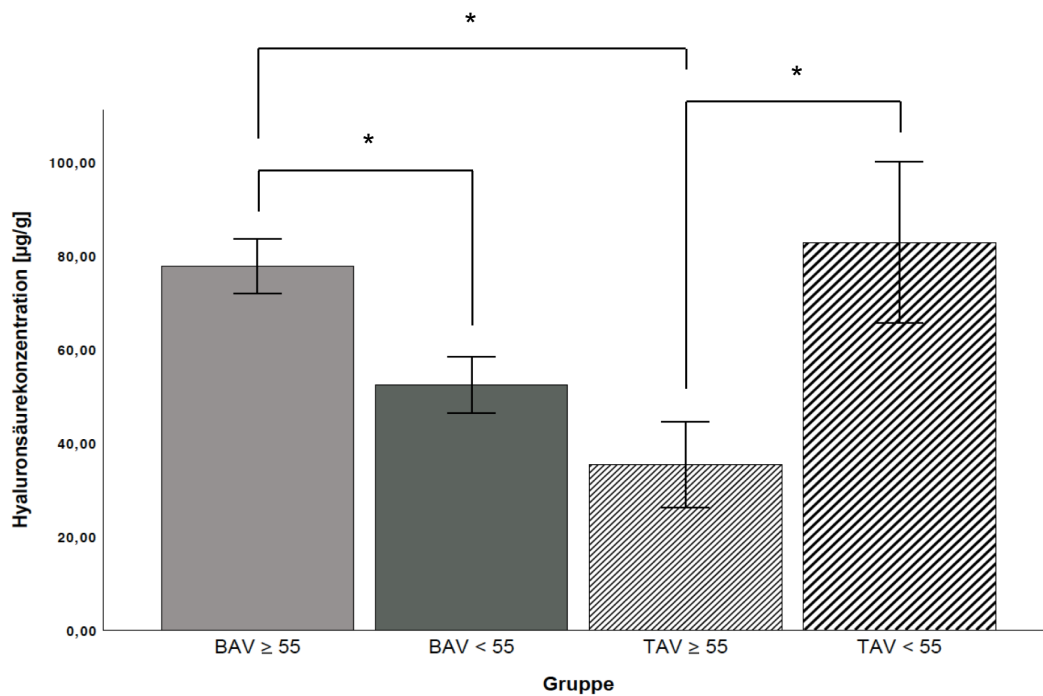


Abbildung 13: Darstellung der Hyaluronsäurekonzentration. Abgebildet sind die Hyaluronsäurekonzentrationen der konvexen Seiten der BAV- und TAV-Gruppen als Mittelwert \pm SEM in $\mu\text{g/g}$ (Aorta-)Nassgewebe. Die mit einem Stern versehenen Klammern kennzeichnen einen statistisch signifikanten ($p \leq 0,05$) Unterschied zwischen den entsprechenden Gruppen.

Die Ergebnisse der Kollagenbestimmung der nach Aortendurchmesser sortierten Gruppen sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Zusammenfassung der Kollagenbestimmung nach Aortendurchmesser sortiert. Dargestellt sind die Werte der konkaven (K) und konvexen Seiten (V) der BAV ≥ 55 -, BAV < 55 -, TAV ≥ 55 - und TAV < 55 -Gruppe in $\mu\text{g/g}$ (Aorta-)Nassgewebe als Mittelwert \pm SEM.

Abschnitt	BAV ≥ 55	BAV < 55	TAV ≥ 55	TAV < 55
Konvex (V)	972 \pm 132	904 \pm 66	862 \pm 72	852 \pm 76
Konkav (K)	735 \pm 79	1042 \pm 88	900 \pm 67	847 \pm 97

Es konnte ein signifikanter Unterschied in der Kollagenkonzentration der konkaven Seiten der BAV-Gruppen nachgewiesen werden. So zeigte sich eine signifikant erhöhte Konzentration an Kollagen bei der BAV-Gruppe < 55 mm gegenüber der BAV-Gruppe ≥ 55 mm (1042 µg ± 88 µg vs. 735 µg ± 79 µg; $p = 0,034$), dargestellt in Abbildung 14.

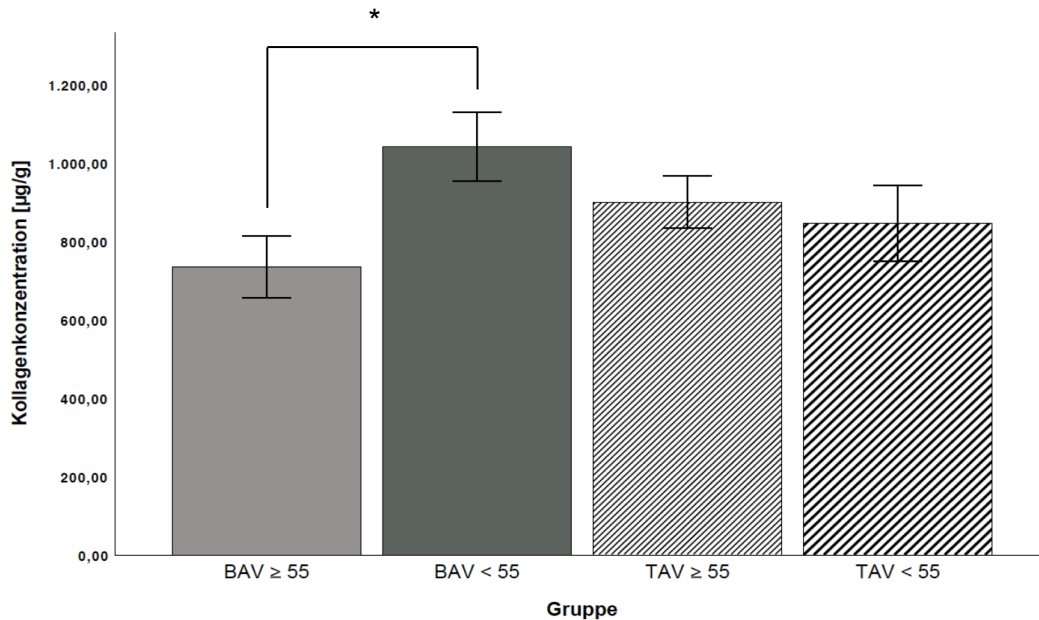


Abbildung 14: Darstellung der Kollagenkonzentration. Abgebildet sind die konkaven Seiten der BAV- und TAV-Gruppen. Die Konzentration wird als Mittelwert ± SEM in µg/g (Aorta-) Nassgewebe angegeben. Die mit einem Stern versehenen Klammern kennzeichnen einen statistisch signifikanten ($p \leq 0,05$) Unterschied zwischen den entsprechenden Gruppen.

Tabelle 18 zeigt die Ergebnisse der Biglycanbestimmung.

Tabelle 18: Zusammenfassung der Biglycanbestimmung nach Aortendurchmesser sortiert. Dargestellt sind die Werte der Biglycanexpression der BAV ≥ 55-, BAV < 55-, TAV ≥ 55- und TAV < 55-Gruppe als Mittelwert ± SEM.

Abschnitt	BAV ≥ 55	BAV < 55	TAV ≥ 55	TAV < 55
Konvex (V)	0,354 ± 0,01	0,737 ± 0,11	0,517 ± 0,18	0,435 ± 0,19
Konkav (K)	0,386 ± 0,09	0,687 ± 0,13	0,418 ± 0,09	0,406 ± 0,14

Hierbei konnte eine signifikant erhöhte Expression von Biglycan in den konvexen Seiten der BAV-Gruppe < 55 mm gegenüber der BAV-Gruppe ≥ 55 mm erfasst werden (0,737 ± 0,11 vs. 0,354 ± 0,01; $p = 0,005$).

5.1.3 Exemplarische Histologie des untersuchten Aortengewebes

Zusätzlich wurden exemplarisch histologische Färbungen an ausgewählten Präparaten durchgeführt, um Veränderungen in der Gewebestruktur vor und nach dem Stretching sichtbar zu machen.

In Abbildung 15 ist eine BAV-Probe dargestellt, die das Stretching durchlaufen hat. Bei dem Versuch kam es zu einem Riss durch alle Wandschichten des untersuchten Präparates. Gut erkennbar ist der Einriss in die *Tunica media* des Präparates. In der HE-Färbung ist eine Verdichtung des Gewebes nach dem Stretching zu vermuten, während in dem Präparat vor dem Stretching eine etwas aufgelockerte Wandstruktur erkennbar ist, möglich ist hier ein Flüssigkeitsverlust im Rahmen des Stretchings. An der Rissstelle ist weiterhin eine vermehrte Kalzifizierung in der *von-Kossa*-Färbung erkennbar.

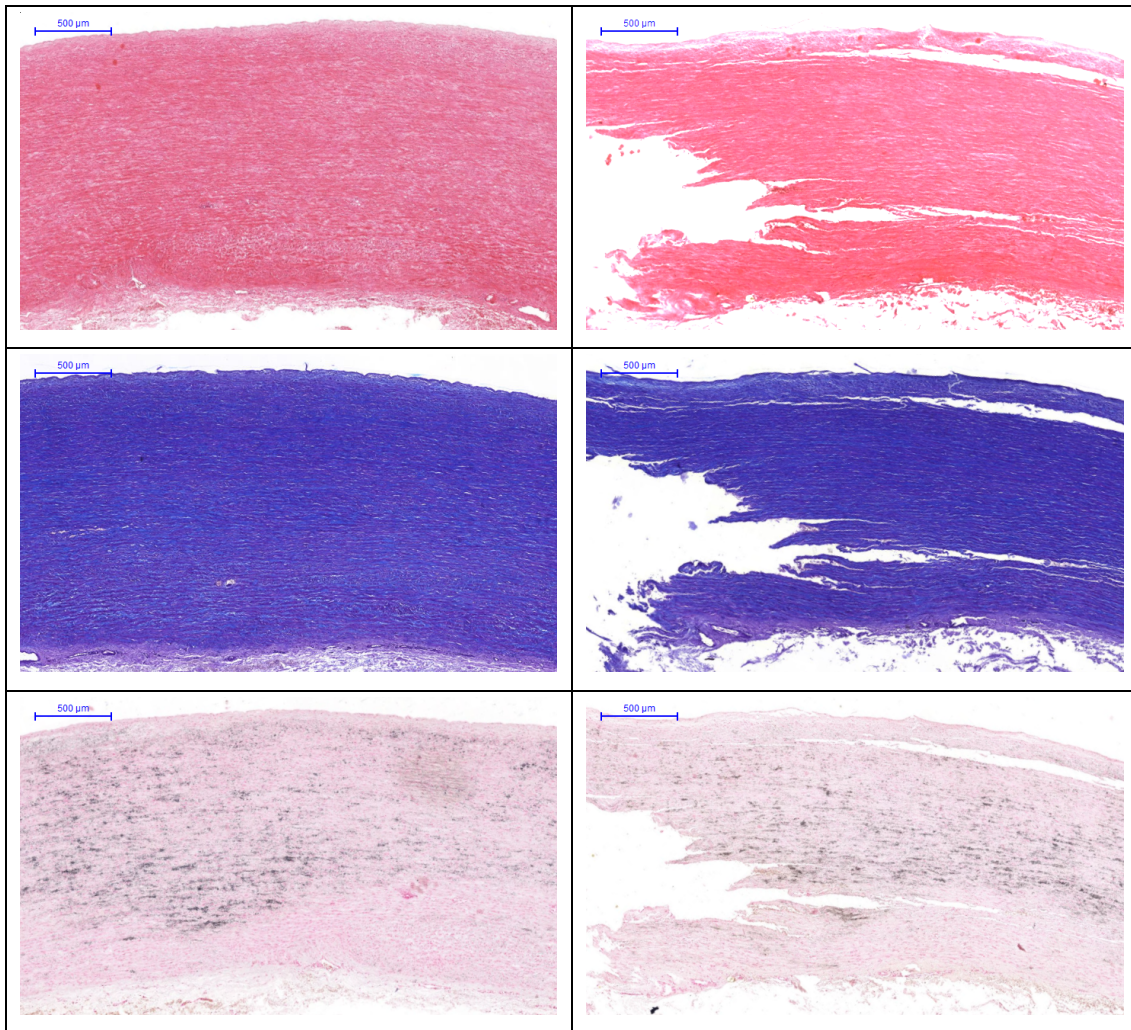


Abbildung 15: Exemplarische Histologie einer gerissenen Aorta. Dargestellt sind drei Färbungen einer gerissenen BAV-Probe (495 V). Dabei wurde jeweils eine Färbung von vor dem Stretching (links) und nach dem Stretching (rechts) durchgeführt. Von oben nach unten ist eine HE-Färbung, Alcian-PAS-Färbung und von-Kossa-Färbung aufgeführt. Im HE-Präparat stellt sich das Bindegewebe rot, die Zellkerne schwarzblau und das Zytoplasma rosa dar. Im Alcian-PAS-Präparat stellen sich die sauren Mukopolysaccharide (Hyaluronsäure) hellblau, die Polysaccharide und neutralen Mukopolysaccharide (sGAG) purpur und die Zellkerne dunkelblau dar. Im von-Kossa-Präparat stellen sich die Kalzium-Salze schwarz bis braun, die Zellkerne rot und das Zytoplasma rosa dar. Die Bilder wurden in 2,5-facher Vergrößerung aufgenommen, der Maßstabsbalken entspricht 500 µm.

In Abbildung 16 sind Färbungen eines nicht gerissenen Präparates einer BAV-Probe dargestellt. In allen drei Färbungen ist eine Verdichtung der Wandstruktur und allgemeine Abflachung des Präparats erkennbar. Weiterhin lassen sich in der HE-Färbung kleine Einrisse innerhalb der *Tunica media* sehen. Die von-Kossa-Färbung zeigt zudem eine vermehrte Kalzifizierung des Präparats.

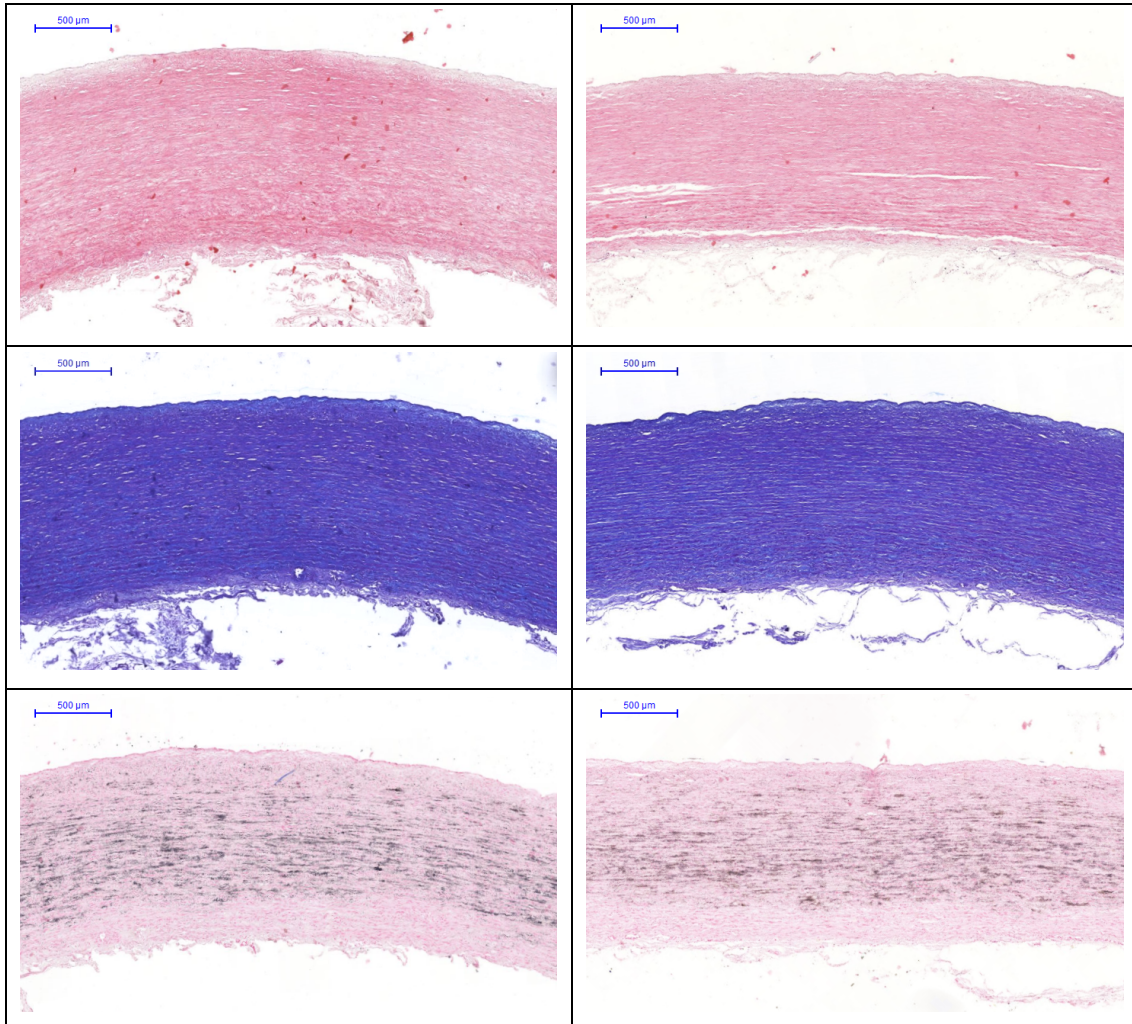


Abbildung 16: Exemplarische Histologie einer nicht gerissenen Aorta. Dargestellt sind drei Färbungen einer gerissenen BAV-Probe (490 V). Dabei wurde jeweils eine Färbung von vor dem Stretching (links) und nach dem Stretching (rechts) durchgeführt. Von oben nach unten ist eine HE-Färbung, Alcian-PAS-Färbung und von-Kossa-Färbung aufgeführt. Im HE-Präparat stellt sich das Bindegewebe rot, die Zellkerne schwarzblau und das Zytoplasma rosa dar. Im Alcian-PAS-Präparat stellen sich die sauren Mukopolysaccharide (Hyaluronsäure) hellblau, die Polysaccharide und neutralen Mukopolysaccharide (sGAG) purpur und die Zellkerne dunkelblau dar. Im von-Kossa-Präparat stellen sich die Kalzium-Salze schwarz bis braun, die Zellkerne rot und das Zytoplasma rosa dar. Die Bilder wurden in 2,5-facher Vergrößerung aufgenommen, der Maßstabsbalken entspricht 500 µm.

5.2 Quantifizierung der Bestandteile der Aortenwand

Unabhängig von dem biomechanischen Stretching wurden die EZM-Bestandteile und weitere Komponenten der Aortenwand bei BAV- und TAV-Patienten untersucht. Dadurch sollte eine parameterunabhängige Vergleichbarkeit zwischen BAV- und TAV-Gruppe erreicht werden.

Für die Patientenpopulation wurde eine annähernd gleich große Menge an BAV- und an TAV-Patienten ausgewählt. Dabei wurde auf die gleichmäßige Verteilung der in Tabelle 19 aufgeführten Parameter geachtet. Dies konnte bei den Klappenvitien nicht gewährleistet werden. Insbesondere wurde versucht Patienten mit Diabetes mellitus von der Studie weitestgehend auszuschließen, um den Einfluss der Erkrankung auf die Verteilung, Clusterbildung und Konzentration der Glykosaminoglykane zu minimieren (McDonald *et al.* 2007; Lorentzen *et al.* 2016). Die Parameter der beiden Gruppen wurden mit dem t-Test und Chi-Quadrat-Test auf Unabhängigkeit getestet. Hierbei zeigten sich signifikante Unterschiede lediglich bei der erhöhten Prävalenz der Aortenklappenstenose bei BAV-Patienten und eine erhöhte Prävalenz der Aortenklappeninsuffizienz bei TAV-Patienten.

Tabelle 19: Patientenpopulation der unabhängigen EZM-Untersuchung. Dargestellt sind die Patientenanzahl (n) und die Verteilungen des Geschlechts, des Alters, des Raucherstatus, von Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie (aHT), koronarer Herzkrankheit (KHK), des Durchmessers der Aorta ascendens (Aorta asc.) der Aortenklappenstenose, Aortenklappeninsuffizienz und des kombinierten Klappenvitiums (Aortenklappenstenose + -insuffizienz). Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) aufgeführt. Die Parameter galten bei einem p-Wert $\leq 0,05$ als signifikant.

Charakteristikum	BAV	TAV	p-Wert
Patientenanzahl (n)	39	37	
Geschlecht (männlich; n, %)	30 (77)	29 (78)	0,879
Alter (Jahre \pm SEM)	61,79 \pm 1,94	63,54 \pm 2,05	0,538
Rauchen (n, %)	16 (41)	12 (32)	0,438
Diabetes (n, %)	0 (0)	2 (5)	0,141
aHT (n, %)	33 (85)	34 (92)	0,326
KHK (n, %)	5 (13)	6 (16)	0,638
Durchmesser der Aorta asc. (mm \pm SEM)	49,56 \pm 0,69	49,78 \pm 1,09	0,865
Aortenklappenstenose	19 (49)	5 (14)	0,001
Aortenklappeninsuffizienz	10 (26)	27 (73)	< 0,001
Kombiniertes Klappenvitium	6 (15)	2 (5)	0,157

5.2.1 Wanddicke der Aorta

Bereits in einer Studie von Haunschild *et al.* zeigte sich eine verminderte Wanddicke der *Tunica media* von BAV- gegenüber TAV-Patienten (Haunschild *et al.* 2017). Zur weiteren Bestimmung der Wanddicke wurde eine HE-Färbung der Präparate durchgeführt. Anschließend konnten die Dicke der *Tunica intima* und *media* ausgemessen werden. Die Summe aus Intima- und Mediadicke ergab die Gesamtdicke des Präparates. Die *Tunica adventitia* wurde nicht in die Untersuchung mit einbezogen, da in Abhängigkeit von der intra- und postoperativen Präparation die vorhandene Menge an Adventitiagewebe variierte. Damit konnte keine Vergleichbarkeit gewährleistet werden.

Die Ergebnisse der Wanddickenbestimmung sind in Tabelle 20 zusammengefasst. Untersucht wurden sowohl die konvexen als auch die konkaven Seiten der Aortenproben.

Tabelle 20: Zusammenfassung der Wanddickenbestimmung. Dargestellt sind die Mittelwerte der konkaven (K) und konvexen Seiten (V) der bikuspiden und trikuspiden Patientenproben in $\mu\text{m} \pm \text{SEM}$. Neben den Untergruppen ist die Anzahl (n) der getesteten Proben angegeben.

Schicht	BAV-K (n=32)	BAV-V (n=32)	TAV-K (n=32)	TAV-V (n=32)
<i>Tunica intima</i>	85 \pm 8	101 \pm 8	138 \pm 9	151 \pm 13
<i>Tunica media</i>	1648 \pm 40	1414 \pm 37	1697 \pm 47	1496 \pm 41
Gesamt	1749 \pm 46	1529 \pm 40	1846 \pm 49	1672 \pm 43

Die Intimadicke der konkaven Seiten der BAV-Gruppe zeigten signifikant erniedrigte Werte gegenüber den konkaven Seiten der TAV-Gruppe (85 $\mu\text{m} \pm 8 \mu\text{m}$ vs. 138 $\mu\text{m} \pm 9 \mu\text{m}$; $p < 0,001$). Auch die konvexen Seiten der BAV-Gruppe waren gegenüber denen der TAV-Gruppe signifikant erniedrigt (101 $\mu\text{m} \pm 8 \mu\text{m}$ vs. 151 $\mu\text{m} \pm 13 \mu\text{m}$; $p = 0,001$), dargestellt in Abbildung 17.

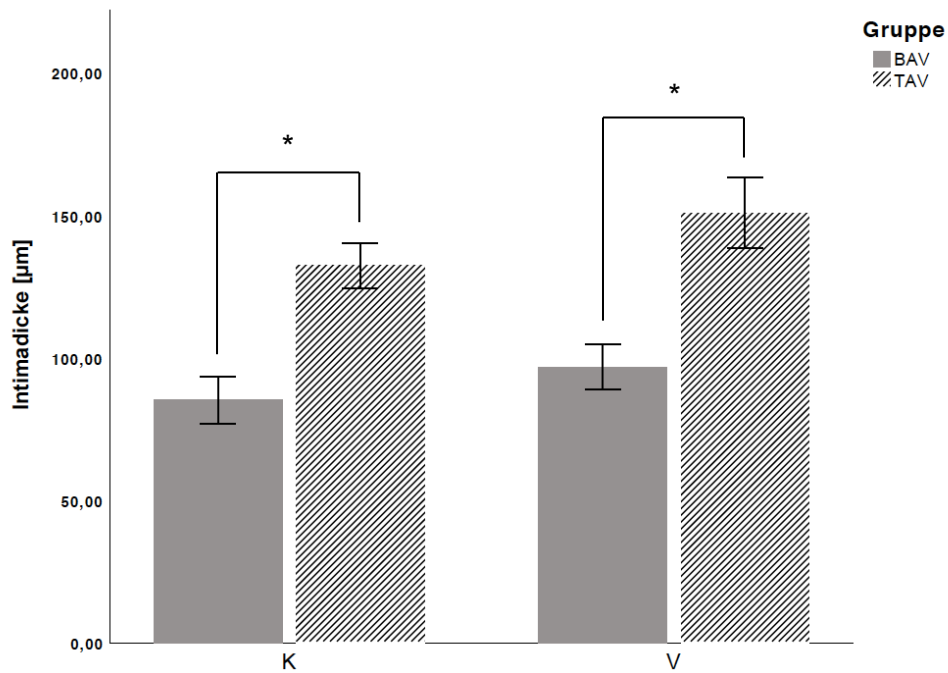


Abbildung 17: Darstellung der Dicke der Tunica intima. Abgebildet sind die konkaven und konvexen Seiten der BAV- und TAV-Gruppe als Mittelwert \pm SEM in μm . Die mit einem Stern versehenen Klammern kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den entsprechenden Gruppen mit $p \leq 0,05$.

Bei der Gesamtdicke der Konvexität konnte eine signifikant verminderte Dicke bei der BAV- gegenüber der TAV-Gruppe ermittelt werden ($1529 \mu\text{m} \pm 40 \mu\text{m}$ vs. $1672 \mu\text{m} \pm 43 \mu\text{m}$; $p = 0,018$). Weiterhin konnte eine signifikant erhöhte Dicke der *Tunica media* der konkaven gegenüber den konvexen Seiten innerhalb der BAV- Gruppe ($1648 \mu\text{m} \pm 40 \mu\text{m}$ vs. $1414 \mu\text{m} \pm 37 \mu\text{m}$; $p < 0,001$) und der TAV- Gruppe ($1697 \mu\text{m} \pm 47 \mu\text{m}$ vs. $1496 \mu\text{m} \pm 41 \mu\text{m}$; $p = 0,001$) berechnet werden. Auch die Gesamtdicke der konkaven Seiten zeigte signifikant erhöhte Werte gegenüber den konvexen Seiten innerhalb der BAV-Gruppe ($1749 \mu\text{m} \pm 46 \mu\text{m}$ vs. $1529 \mu\text{m} \pm 40 \mu\text{m}$; $p < 0,001$) und der TAV-Gruppe ($1846 \mu\text{m} \pm 49 \mu\text{m}$ vs. $1672 \mu\text{m} \pm 43 \mu\text{m}$; $p = 0,005$), dargestellt in Abbildung 18.

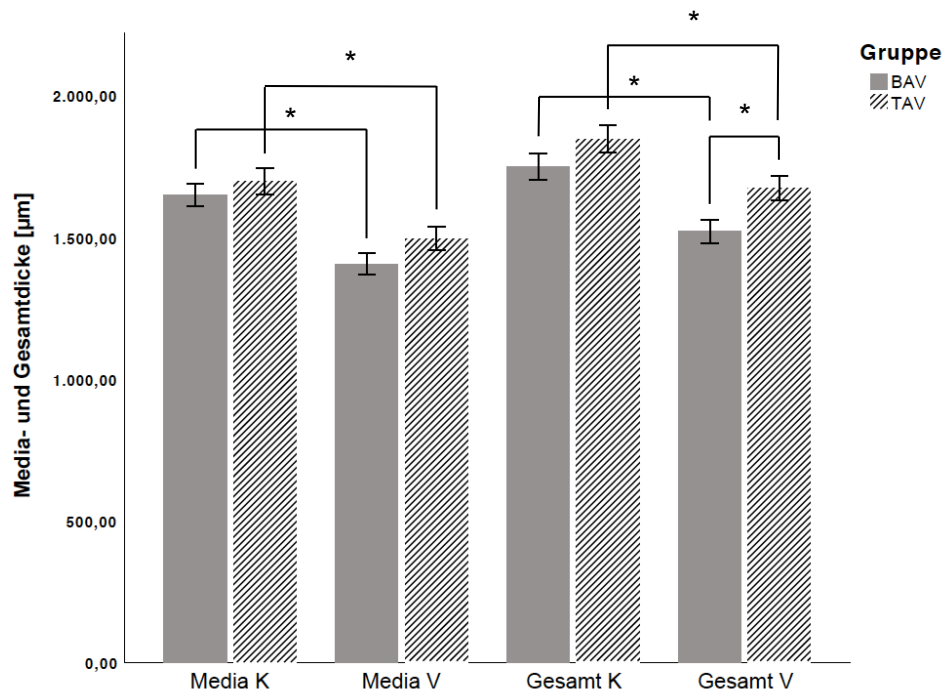


Abbildung 18: Darstellung der Media- und Gesamtdicke. Abgebildet sind die Media- und Gesamtdicken der konkaven und konvexen Seiten der BAV- und TAV-Gruppe als Mittelwert \pm SEM in μm . Die mit einem Stern versehenen Klammern kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den entsprechenden Gruppen mit $p \leq 0,05$.

In Abbildung 19 ist eine HE-Färbung eines BAV- und TAV-Präparats dargestellt. Diese zeigt eine dichtere Struktur im BAV-Präparat, während das TAV-Präparat aufgelockert erscheint. Zudem fällt der Unterschied in der Dicke der *Tunica intima* ins Auge. Während das BAV-Präparat nur eine dünne *Tunica intima* aufweist, ist bei dem TAV-Präparat eine prominente, vergrößerte *Tunica intima* zu erkennen.

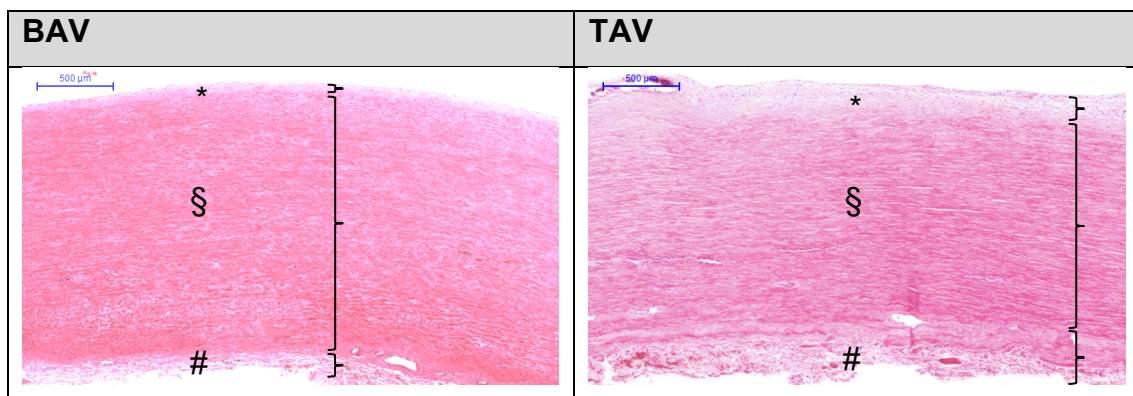


Abbildung 19: HE-Färbung eines BAV- und TAV-Präparats. Abgebildet sind die konvexen Seiten (V) mit *Tunica intima* (*), *Tunica media* (§) und *Tunica adventitia* (#), deren Dicke zur Veranschaulichung mit Klammern gekennzeichnet wurde. In diesem Präparat stellt sich das Bindegewebe rot, die Zellkerne schwarzblau und das Zytoplasma rosa dar. Die Bilder wurden in 2,5-facher Vergrößerung aufgenommen, der Maßstabsbalken entspricht 500 μm .

5.2.2 Hyaluronsäure

Die Hyaluronsäurekonzentration wurde im Aortengewebe von Patienten mit bikuspiden und trikuspiden Aortenklappen bestimmt. Die Konzentration wurde in $\mu\text{g/g}$ (Aorta-)Nassgewebe bestimmt werden.

Die Ergebnisse der Hyaluronsäurebestimmung sind in der Tabelle 21 zusammengefasst. Untersucht wurden sowohl die konvexen als auch die konkaven Seiten der Aortenproben.

Tabelle 21: Zusammenfassung der Hyaluronsäurebestimmung. Dargestellt sind die Werte der konkaven (K) und konvexen Seiten (V) der bikuspiden und trikuspiden Patientenproben in $\mu\text{g/g}$ (Aorta-) Nassgewebe als Mittelwert \pm SEM. Neben den Untergruppen ist die Anzahl (n) der getesteten Proben angegeben.

	BAV-K (n=29)	BAV-V (n=32)	TAV-K (n=32)	TAV-V (n=32)
HS	128 \pm 9	112 \pm 9	111 \pm 10	102 \pm 9

Wie in Abbildung 20 dargestellt sind die Mittelwerte der Hyaluronsäurekonzentration sowohl in konkaven, als auch den konvexen Seiten der BAV-Gruppe gegenüber der TAV-Gruppe erhöht. Jedoch konnte kein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

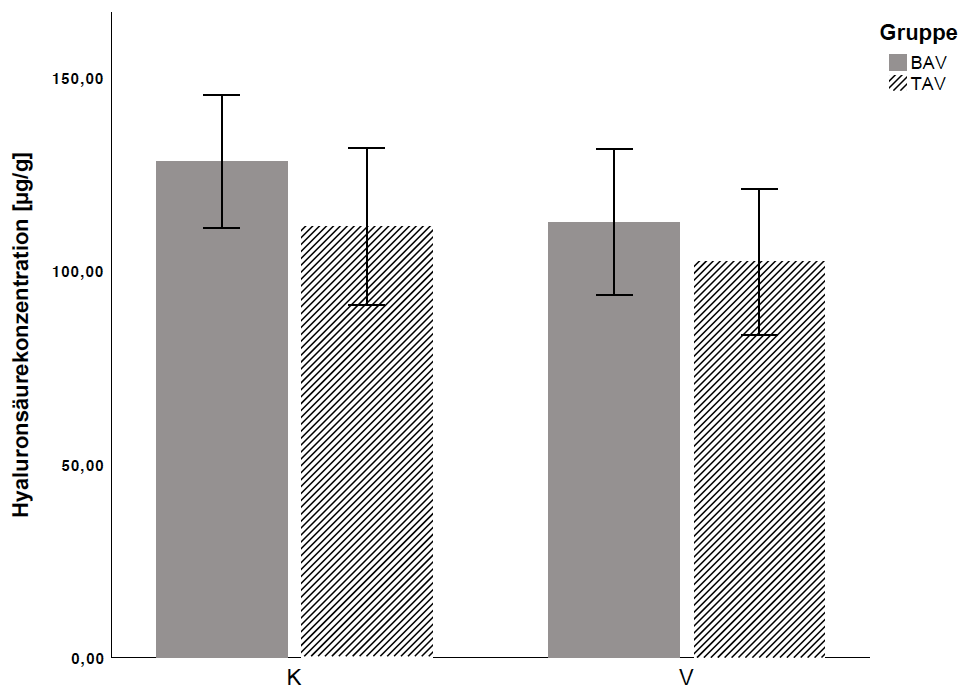


Abbildung 20: Darstellung der Hyaluronsäurekonzentration. Abgebildet sind die konkaven und konvexen Seiten der BAV- und TAV-Gruppe als Mittelwert \pm SEM in $\mu\text{g/g}$ (Aorta-) Nassgewebe.

5.2.3 GAG

Die GAG-Konzentration wurde im Aortengewebe von BAV- und TAV-Patienten untersucht. Hierbei konnte die Konzentration in $\mu\text{g/g}$ (Aorta-)Nassgewebe bestimmt werden.

Die Ergebnisse der GAG-Bestimmung sind in Tabelle 22 zusammengefasst. Untersucht wurden sowohl die konvexen als auch die konkaven Seiten der Aortenproben.

Tabelle 22: Zusammenfassung der GAG-Bestimmung. Dargestellt sind die Werte der konkaven (K) und konvexen Seiten (V) der bikuspiden und trikuspiden Patientenproben in $\mu\text{g/g}$ (Aorta-)Nassgewebe als Mittelwert \pm SEM. Neben den Untergruppen ist die Anzahl (n) der getesteten Proben angegeben.

	BAV-K (n=29)	BAV-V (n=29)	TAV-K (n=27)	TAV-V (n=27)
GAG	550 \pm 36	531 \pm 36	486 \pm 32	485 \pm 29

Sowohl die konkaven, als auch die konvexen Seiten der BAV-Gruppe wiesen erhöhte GAG-Konzentrationen in der Aortenwand gegenüber der TAV-Gruppe auf. Jedoch zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten, dargestellt in Abbildung 21.

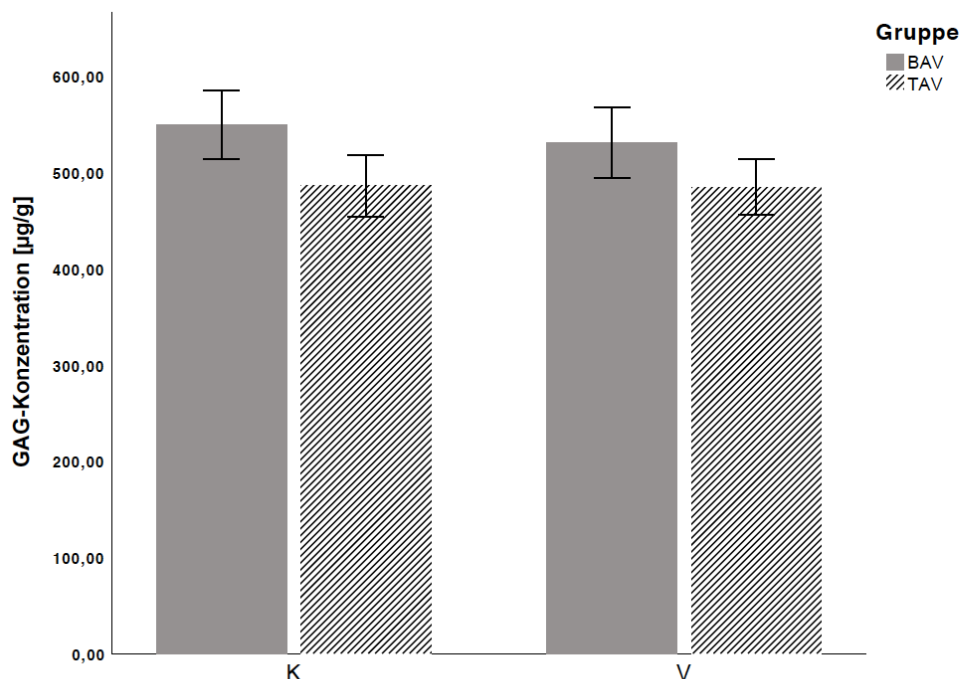


Abbildung 21: Darstellung der GAG-Konzentration. Abgebildet sind die konkaven und konvexen Seiten der BAV- und TAV-Gruppe als Mittelwert \pm SEM in $\mu\text{g/g}$ (Aorta-)Nassgewebe.

5.2.4 Verteilung und Clusterbildung der Hyaluronsäure

Die vermehrte Zusammenlagerung (Clusterbildung) und Umverteilung der Glykosaminoglykane, u.a. der Hyaluronsäure wurde bereits als möglicher Risikofaktor der Aortendissektion beschrieben. Das Ziel dieser Untersuchung war es Unterschiede in der Verteilung und Clusterbildung der Hyaluronsäure zwischen BAV- und TAV-Patienten auszumachen. Dazu wurde eine Alcianblau-PAS-Färbung durchgeführt, die eine hellblaue Anfärbung der sauren Mukosubstanzen, speziell der Hyaluronsäure ermöglichte. Die Ergebnisse beruhen auf dem Grading, das in Tabelle 4 und Tabelle 5 (s. Kapitel 4.18.2) dargestellt ist. Es wurden insgesamt 54 Proben untersucht (25 BAV, 29 TAV).

Beim Grad der Clusterbildung zeigten die konkaven Seiten der BAV- und TAV-Gruppe keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,657$). Bei den konvexen Seiten zeigten sich vermehrt Clusterbildungen bei der TAV-Gruppe gegenüber der BAV-Gruppe. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p = 0,086$), wie in Abbildung 22 dargestellt.

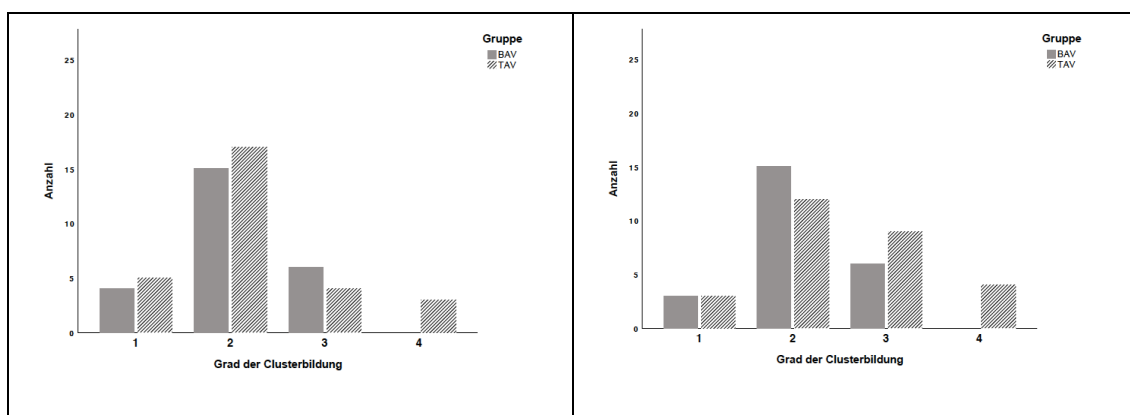


Abbildung 22: Darstellung der Hyaluronsäure-Clusterbildung. Abgebildet sind die Grade der Hyaluronsäure-Clusterbildung der konkaven (rechts) und konvexen Seiten (links) der BAV- und TAV-Gruppe. Die Zahlen geben den Grad der Hyaluronsäure-Clusterbildung an: 1: keine Clusterbildung, 2: geringgradige Clusterbildung, 3: mittelgradige Clusterbildung, 4: hochgradige Clusterbildung (vgl. Kapitel 4.18.2).

Bei der Verteilung der Hyaluronsäure konnten weder in der konkaven ($p = 0,192$), noch in der konvexen Seite ($p = 0,356$) signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ausgemacht werden, siehe auch Abbildung 23.

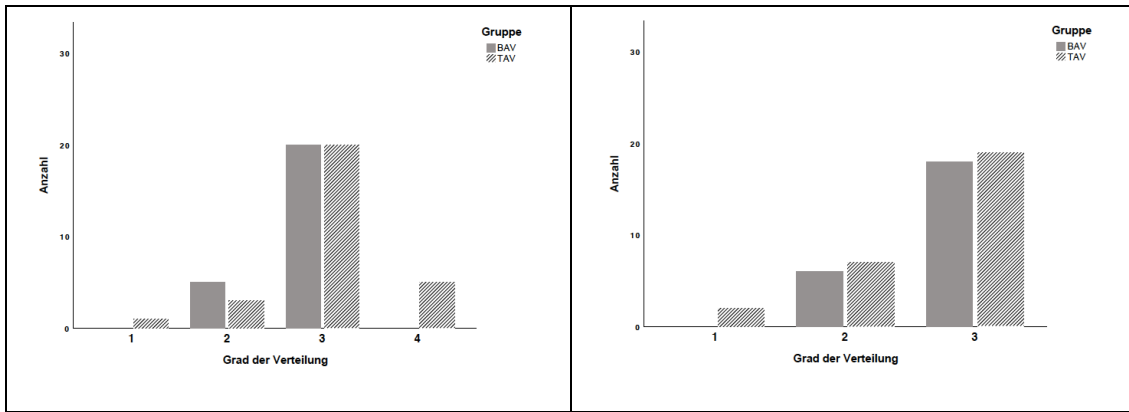


Abbildung 23: Darstellung der Hyaluronsäure-Verteilung. Abgebildet sind die Grade der Hyaluronsäure-Verteilung der konkaven (rechts) und konvexen Seiten (links) der BAV- und TAV-Gruppe. Die Zahlen geben die Form der Hyaluronsäure-Verteilung an: 1: Intima >> Media, 2: Intima > Media, 3: Intima = Media, 4: Intima < Media (vgl. Kapitel 4.18.2).

5.2.5 Biglycan

Das Proteoglykan Biglycan spielt eine wesentliche Rolle in der EZM. Zur Vervollständigung der erhaltenen Ergebnisse der Assays von Hyaluronsäure und GAG wurde die Biglycanexpression mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immundetektion bestimmt.

Biglycan ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 42 kDa. Dieses wurde in der Auswertung durch die Expression von GAPDH, als Ladekontrolle, dividiert. Im Westernblot stellten sich Biglycan und GAPDH wie in Abbildung 24 zu sehen dar.

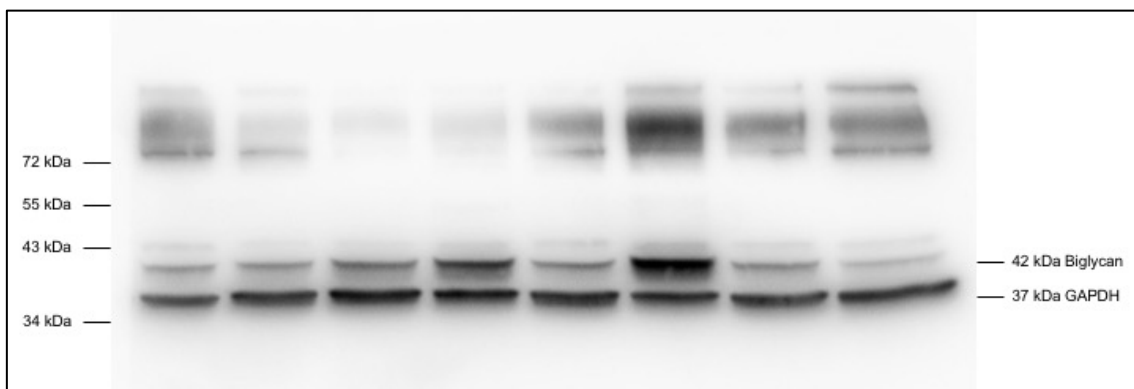


Abbildung 24: Darstellung von Biglycan und GAPDH im Western Blot. Die Bandenreihe auf Höhe von 42 kDa stellt Biglycan, die Bandenreihe auf Höhe 37 kDa GAPDH dar. Im dargestellten Western Blot betrug die Probenmenge 20 µg, die Verdünnung der Primärantikörper anti-Biglycan 1:2000, anti-GAPDH 1:4000 und des Sekundärantikörpers anti-Mouse 1:10000.

Die Daten der Biglycanexpression zeigten eine logarithmische Normalverteilung. Diese kann durch logarithmische Transformierung der Originalwerte erreicht

werden (Olivier *et al.* 2008). Die Daten können dabei sowohl positive, als auch negative Werte annehmen. Nach Transformierung der Daten wurden die in Tabelle 23 zusammengefassten Daten ermittelt.

Tabelle 23: Zusammenfassung der Biglycanbestimmung. Dargestellt sind die logtransformierten Werte der Biglycanexpression als Mittelwert \pm SEM. Neben den Untergruppen ist die Anzahl (n) der getesteten Proben angegeben.

	BAV-K (n=35)	BAV-V (n=36)	TAV-K (n=34)	TAV-V (n=36)
Biglycan	-0,149 \pm 0,06	-0,187 \pm 0,06	-0,157 \pm 0,09	-0,142 \pm 0,06

Wie in Abbildung 25 dargestellt zeigten die Ergebnisse keine signifikanten Unterschiede zwischen den konvexen Seiten der BAV- und TAV-Gruppe. Auch die konkaven Seiten beider Gruppen waren nicht signifikant unterschiedlich.

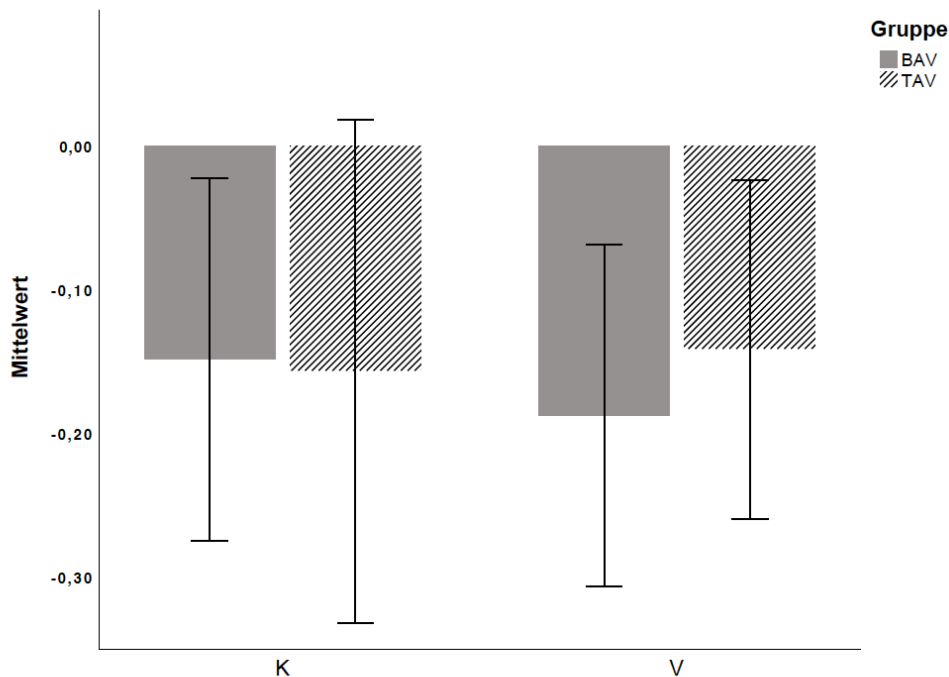


Abbildung 25: Darstellung der Biglycanexpression. Abgebildet sind die logarithmierten Biglycanexpressionen der konkaven und konvexen Seiten der BAV- und TAV-Gruppe als Mittelwert \pm SEM.

5.2.6 Elastin

Die Quantifizierung der Elastinkonzentration diente der Bestimmung der elastischen Eigenschaften des untersuchten Aortengewebes.

Die Daten der Elastinkonzentration folgten einer logarithmischen Normalverteilung. Nach logarithmischer Transformierung der ermittelten Daten konnten die in Tabelle 24 dargestellten Werte berechnet werden.

Tabelle 24: Zusammenfassung der Elastinbestimmung. Dargestellt sind die logtransformierten Werte der Elastinbestimmung als Mittelwert \pm SEM. Neben den Untergruppen ist die Anzahl (n) der getesteten Proben angegeben.

	BAV-K (n=28)	BAV-V (n=28)	TAV-K (n=27)	TAV-V (n=27)
Elastin	3,25 \pm 0,03	3,21 \pm 0,03	3,17 \pm 0,03	3,2 \pm 0,03

Die konvexen Seiten zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen BAV- und TAV-Gruppe. Jedoch ist eine Tendenz erkennbar, die eine erhöhte Konzentration von Elastin in der BAV-K- gegenüber der TAV-K-Gruppe zeigte (3,25 \pm 0,03 vs. 3,17 \pm 0,03; $p = 0,069$), dargestellt in Abbildung 26.

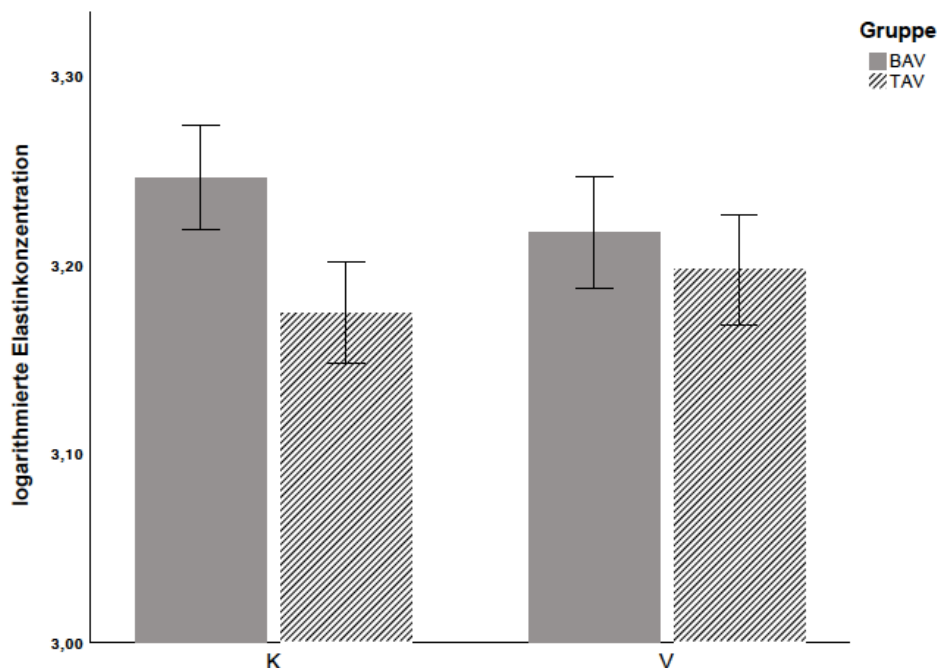


Abbildung 26: Darstellung der Elastinkonzentration. Abgebildet ist die logarithmierte Elastinkonzentration der konkaven und konvexen Seiten der BAV- und TAV-Gruppe als Mittelwert \pm SEM.

5.2.7 Kollagen

Kollagen bestimmt maßgeblich die Steifigkeit des Aortengewebes. Mit diesem Test wurde die Konzentration von Kollagen in dem Aortengewebe von BAV- und TAV-Patienten bestimmt. Die ermittelten Daten der Kollagenbestimmung sind in Tabelle 25 dargestellt.

Tabelle 25: Zusammenfassung der Kollagenbestimmung. Dargestellt sind die Werte der konkaven (K) und konvexen Seiten (V) der bikuspiden und trikuspiden Patientenproben in $\mu\text{g/g}$ (Aorta-)Nassgewebe als Mittelwert \pm SEM. Neben den Untergruppen ist die Anzahl (n) der getesteten Proben angegeben.

	BAV-K (n=27)	BAV-V (n=27)	TAV-K (n=25)	TAV-V (n=26)
Kollagen	997 \pm 55	1059 \pm 58	893 \pm 60	876 \pm 59

Die Ergebnisse zeigen keinen Zusammenhang zwischen Klappentyp und Kollagenkonzentration der konkaven Seiten. Jedoch konnten signifikant erhöhte Kollagenkonzentrationen in den konvexen Seiten der BAV- gegenüber denen der TAV-Gruppe ermittelt werden (1059 $\mu\text{g} \pm 60 \mu\text{g}$ vs. 876 $\mu\text{g} \pm 59 \mu\text{g}$; $p = 0,032$). Diese Unterschiede wurden in Abbildung 27 grafisch festgehalten.

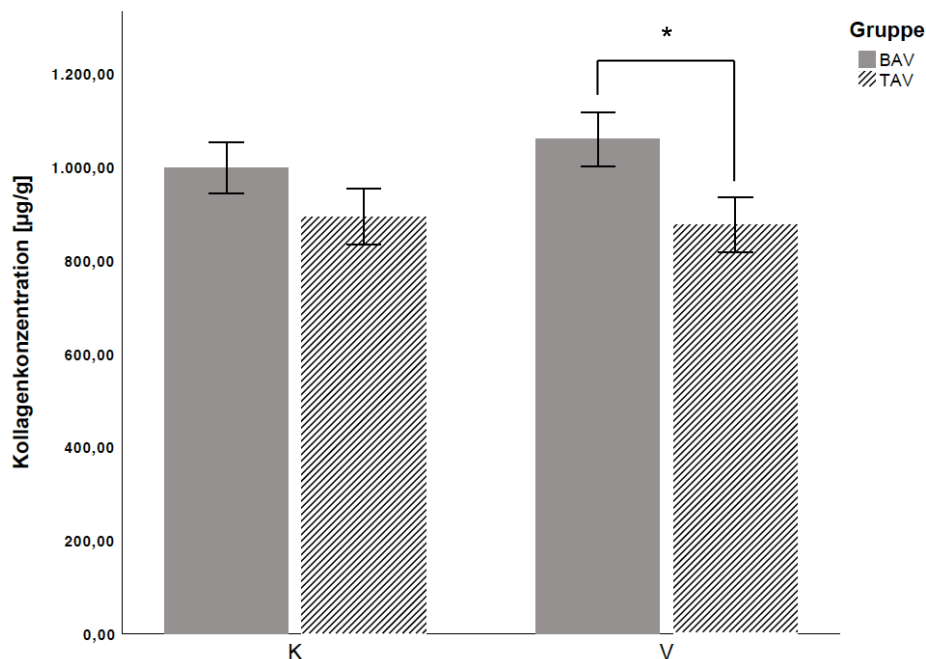


Abbildung 27: Darstellung der Kollagenkonzentration. Abgebildet ist die Kollagenkonzentration der konkaven und konvexen Seiten der BAV- und TAV-Gruppe als Mittelwert \pm SEM in $\mu\text{g/g}$ (Aorta-)Nassgewebe. Die mit einem Stern versehenen Klammern kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den entsprechenden Gruppen mit $p \leq 0,05$.

5.2.8 Kalzifizierung

Eine vermehrte Kalzifizierung in der *Media* der Aorten von BAV-Patienten wurde bereits beschrieben (Haunschild *et al.* 2017). Da ein Zusammenhang zwischen der Mediakalzifizierung und der Reißfestigkeit denkbar ist, erfolgte mittels der *von-Kossa*-Färbung eine Quantifizierung der Kalzifizierung der Aortenwand von BAV- und TAV-Patienten. Dafür wurde der prozentuale Anteil der Kalziumsalze am Gesamtpräparat ermittelt.

Die Werte der Kalzifizierungsbestimmung folgten einer logarithmischen Normalverteilung. Durch Anwendung eines Logarithmus auf die erhobenen Daten konnten die Werte transformiert werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der Tabelle 26 dargestellt.

Tabelle 26: Quantifizierung der Kalzifizierung. Dargestellt sind die logarithmierten Werte der Kalzifizierungsbestimmung als Mittelwert \pm SEM. Neben den Untergruppen ist die Anzahl (n) der getesteten Proben angegeben.

	BAV-K (n=25)	BAV-V (n=25)	TAV-K (n=29)	TAV-V (n=29)
Kalzifizierung	0,65 \pm 0,1	0,92 \pm 0,08	0,02 \pm 0,14	0,18 \pm 0,12

Wie in Abbildung 28 dargestellt zeigte der Vergleich zwischen den konkaven Seiten der BAV- zur TAV-Gruppe signifikant erhöhte Kalzifizierungswerte der BAV-Gruppe (0,65 \pm 0,1 vs. 0,02 \pm 0,14; $p = 0,001$). Auch bei den konvexen Seiten sind signifikant erhöhte Werte bei der BAV-Gruppe gegenüber der TAV-Gruppe erkennbar (0,92 \pm 0,08 vs. 0,18 \pm 0,12; $p < 0,001$). Vergleicht man die Werte der konkaven und konvexen Seiten innerhalb ihrer Gruppen sieht man lediglich in der BAV-Gruppe einen signifikanten Unterschied. Dabei zeigen die konvexen gegenüber den konkaven Seiten einen deutlich erhöhten Mittelwert auf (0,92 \pm 0,08 vs. 0,65 \pm 0,1; $p = 0,003$).

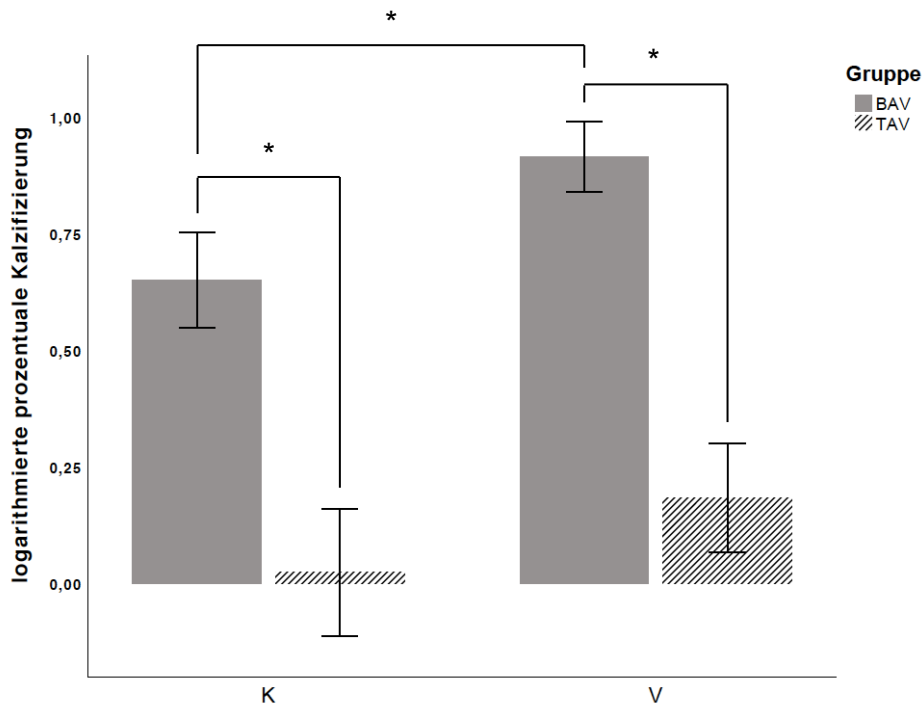


Abbildung 28: Darstellung der Kalzifizierung. Abgebildet sind die logarithmierten Mittelwerte \pm SEM. Die mit einem Stern versehenen Klammern kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den entsprechenden Gruppen mit $p \leq 0,05$.

In Abbildung 29 ist eine von-Kossa-Färbung eines BAV- und TAV-Präparats dargestellt. Erkennbar ist die deutlich vermehrte Schwarzfärbung und damit Kalzifizierung des BAV- gegenüber dem TAV-Präparat.

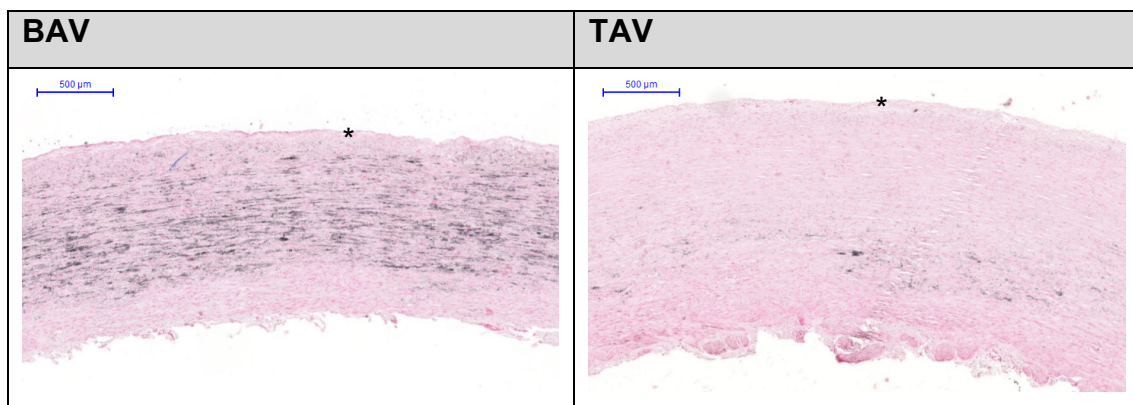


Abbildung 29: Von-Kossa-Färbung eines BAV- und TAV-Präparats. Abgebildet sind die konvexen Seiten (V), dabei ist zur besseren Orientierung die Intima (*) gekennzeichnet. In diesem Präparat stellen sich die Kalzium-Salze schwarz bis braun, die Zellkerne rot und das Zytoplasma rosa dar. Die Bilder wurden in 2,5-facher Vergrößerung aufgenommen, der Maßstabsbalken entspricht 500 μ m.

6 Diskussion

Die bikuspidale Aortenklappe ist mit 0,4 – 2 % die häufigste angeborene Fehlbildung des Herzens (Roberts 1970; Ward 2000; Hoffman und Kaplan 2002; Tutar *et al.* 2005). Insbesondere Aortenaneurysmen und -dissektionen stellen folgenschwere Komplikationen der bikuspiden Aortenklappe dar (Ward 2000; Tzemos *et al.* 2008; Masri *et al.* 2017). Die biomechanischen Eigenschaften der Aorta werden neben dem bereits etablierten Parameter des Aortendurchmessers als möglicher Parameter für das Rupturrisiko diskutiert (Cheheltani *et al.* 2014). Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der biomechanischen Eigenschaften der Aorta im Zugversuch (Stretching). Weiterhin sollten die EZM-Bestandteile der gestreckten Aorten untersucht werden, um weitere Erkenntnisse zu deren Einfluss auf die Reaktion von Aortengewebe auf mechanische Belastung zu erlangen.

Die Aorta ist eine Arterie vom elastischen Typ. Mit der Windkesselfunktion sorgt sie über eine passive Dehnung in der Systole für einen kontinuierlichen und pulsierenden Blutfluss in der Diastole mittels ihrer elastischen Rückstellkräfte (Aumüller und Wurzing 2010). Diese Eigenschaften sind maßgeblich mit der Zusammensetzung der EZM verknüpft. Während Elastin in den herznahen Arterien den Hauptbestandteil der EZM darstellt und in den peripheren muskulären Arterien abnimmt, zeigt sich bei Kollagen ein gegensätzlicher Verlauf (Cheheltani *et al.* 2014).

Roccabianca *et al.* diskutierten bereits die Glykosaminoglykane als mögliche Risikofaktoren für das Auftreten einer Aortendissektion (Roccabianca *et al.* 2014b). Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob die durch die Glykosaminoglykane ausgelöste *Donnan-Schwellung* eine Erklärung für das erhöhte Dissektionsrisiko bei BAV-Patienten liefern könnte. Vorangegangene Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten zudem vermehrte Kalziumablagerungen in der *Media* von BAV-Patienten identifizieren. Außerdem wiesen die BAV-Aorten im Vergleich zur TAV-Gruppe unterschiedliche Dicken in der *Intima* und *Media* der Gefäßwand auf (Haunschild *et al.* 2017). Zur Vervollständigung des Gesamtbildes von den Bestandteilen der Aortenwand von bikuspiden und trikuspiden Patienten wurden diese beiden Parameter zusätzlich untersucht.

6.1 Diskussion des biomechanischen Stretchings

6.1.1 Untersuchung anhand des Elastizitätsmoduls

Die vorliegende Arbeit konnte zwei verschiedene Untergruppen der BAV-Aorten im Stretchversuch identifizieren. Dabei wies die BAV-2-Gruppe signifikant höhere Elastizitätsmodule gegenüber der BAV-1- und TAV-Gruppe auf. Die BAV-1-Gruppe unterschied sich nicht signifikant von der TAV-Gruppe.

Das hier bestimmte Elastizitätsmodul spiegelt die Steifigkeit der untersuchten Aortenprobe bei erhöhter Belastung wider. Je höher das Elastizitätsmodul, desto höher die Steifigkeit des Gefäßes (Li *et al.* 2016). In Bezug auf die Steifigkeit und Dehnbarkeit von arteriellen Gefäßen spielen insbesondere Elastin und Kollagen eine entscheidende Rolle. Elastin ist verantwortlich für die deformierbaren Eigenschaften der Aorta, die eine phasische Dehnung und Entspannung der Aortenwand ermöglichen. Dadurch zeichnet es sich mit einem niedrigen Elastizitätsmodul aus (Niwa *et al.* 2001). Kollagen ist verantwortlich für die zunehmende Steifigkeit des Gefäßes mit zunehmender Belastung (Samila und Carter 1981). Das in der vorliegenden Arbeit bestimmte E-Modul ist somit am Ehesten von dem enthaltenen Kollagen abhängig (Azadani *et al.* 2012; Kobielarz *et al.* 2015; Ferrara *et al.* 2018). Insbesondere die Ergebnisse der Subgruppe (BAV-2) gehen konform mit verschiedenen Arbeiten, die eine erhöhte Stärke und Steifigkeit der Aorta bei BAV-Patienten feststellten (Choudhury *et al.* 2009; Forsell *et al.* 2014; Longobardo *et al.* 2017). Ferrara *et al.* beschrieben hingegen keine signifikanten Unterschiede im E-Modul von BAV- und TAV-Patienten (Ferrara *et al.* 2018). Diese Ergebnisse entsprechen den Ergebnissen der BAV-1-Gruppe, die sich ebenfalls nicht signifikant von der TAV-Gruppe unterscheidet. Hier spiegelt sich bereits ganz eindeutig die Heterogenität der Patienten mit einer BAV wider, wodurch der Durchmesser als geeigneter Parameter für den prophylaktischen Ersatz der *Aorta ascendens* stark in Frage gestellt wird.

Untersucht wurden die konvexen und konkaven Seiten der Aorten von BAV- und TAV-Patienten. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den E-Modulen der konvexen und konkaven Seiten der BAV-2-Gruppe. Es wird davon ausgegangen, dass insbesondere die konvexen Seiten der BAV-Aorten von

erhöhten hämodynamisch bedingten Scherkräften ausgesetzt sind (Cao *et al.* 2017). Daraus lässt sich schließen, dass das E-Modul und die damit assoziierte Steifigkeit des Aortengewebes von hämodynamischen Veränderungen eher unberührt bleibt und vielmehr intrinsische Mechanismen die Elastizität beeinflussen. Eine Arbeit von Babu *et al.* untersuchte die biomechanischen Eigenschaften der *Aorta ascendens*. Dabei konnten sie eine signifikant erhöhte Steifigkeit bei disseziiertem Gewebe gegenüber der Kontrollgruppe feststellen (Babu *et al.* 2015). Die Identifizierung der zugrundeliegenden Mechanismen der erhöhten Steifigkeit der BAV-2-Gruppe könnte somit bedeutende Hinweise auf mögliche Ursachen und Risikofaktoren der Aortendissektion liefern.

Kollagenfasern sind vorwiegend zirkumferentiell in der Aortenwand angeordnet (Azadani *et al.* 2012). Folglich kann man davon ausgehen, dass die zirkumferentielle Anordnung longitudinale Einrisse in die *Media* weniger wahrscheinlich macht. Bestätigt wird dies durch eine Studie, die Einrisse vorwiegend in zirkumferentieller Richtung identifizieren konnte (Choudhury *et al.* 2009). Durch das Stretching wurden die Aortenproben in zirkumferentieller Richtung auseinandergezogen. Dabei wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten eine erhöhte Steifigkeit von Aortengewebe in zirkumferentieller Ausrichtung beobachtet (Gundiah *et al.* 2008). Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Steifigkeit von BAV-Aorten trotz dünnerer Aortenwand könnte somit eine vermehrte Ausrichtung der Kollagenfasern in zirkumferentieller Richtung sein (Sokolis *et al.* 2012; Forsell *et al.* 2014). Dies könnte die signifikant erhöhten E-Module der BAV-2-Gruppe bei nur leicht erhöhten Kollagenkonzentrationen erklären. Die bereits erwähnten Unterschiede in der Prävalenz der KHK, insbesondere in der BAV-2-Gruppe, könnten über den verminderten Kollagen-III-Gehalt in der Aortenwand (Kong *et al.* 2013) für die signifikant erhöhten E-Module sprechen. So zeigte sich in einer Arbeit von Silver *et al.* bei Kollagen III eine signifikant verminderte elastische Federkonstante in der Aorta gegenüber seinem Pendant im Sehngewebe. Die Federkonstante wird dabei als Maß für die Elastizität des untersuchten Gewebes genutzt (Wei 2011). Dadurch konnten Silver *et al.* eine positive Korrelation zwischen Kollagen III und der Flexibilität der Kollagenfasern in der Aortenwand feststellen (Silver *et al.* 2001). Aufgrund der erhöhten KHK-Prävalenz in der BAV-2-Gruppe könnte es zu einem verminderten

Kollagen-III-Gehalt in der Aorta kommen (Kong *et al.* 2013). Damit würde die Flexibilität des Aortengewebes abnehmen. Konsekutiv würde die Steifigkeit bzw. das E-Modul der entsprechenden Gewebeproben zunehmen und könnte damit die erhöhten E-Module der BAV-2-Gruppe erklären.

Die vorliegende Arbeit konnte erhöhte Konzentrationen von Kollagen in den konkaven und konvexen Seiten der BAV-Subgruppe (BAV-2) nachweisen. Die erhöhten Konzentrationen könnten eine Erklärung für die erhöhten E-Module in dieser Gruppe darstellen. Das drei- bis vierfach erhöhte E-Modul der BAV-Subgruppe (BAV-2) lässt aufgrund seiner Assoziation zu Kollagen deutliche Unterschiede der Gruppen in der Kollagenkonzentration vermuten. Eine Erklärung für den erhöhten, aber nicht signifikanten Unterschied in der Kollagenkonzentration könnte das Alter der untersuchten Patientengruppen darstellen. In vorangegangenen Arbeiten zeigte sich eine altersabhängige zunehmende Steifigkeit der Aorta, die mit einer verminderten Compliance und erhöhten Blutdruckamplitude einhergeht (Zulliger und Stergiopoulos 2007). Dies könnte auf eine Zunahme des Kollagens im Gefäß (Myers und Lang 1946; Sans und Moragas 1993; Tsamis *et al.* 2013) oder die frühzeitigere Rekrutierung von Kollagenfasern bei Belastung zurückzuführen sein (Samila und Carter 1981). Durch die tendenziell älteren Patienten in der TAV-Gruppe könnte eine vermehrte altersabhängige Steifigkeit den Unterschied sowohl im E-Modul, als auch in der Kollagenkonzentration geringer erscheinen lassen, als er es bei einer Gleichverteilung wäre. Des Weiteren zeigte die hier untersuchte Patientenpopulation Unterschiede in der Verteilung des Geschlechts. Während in den BAV-Gruppen nur Männer vertreten waren, bestand die TAV-Gruppe zu 75 % aus männlichen Patienten. In einer Studie von Lee *et al.* wurde die geschlechterabhängige Zusammensetzung und das Remodeling der EZM in Aorten von BAV-Patienten mit thorakalem Aneurysma untersucht. Hierbei zeigte sich eine vermehrte Degradierung von Kollagen und SMC bei den männlichen gegenüber den weiblichen Probanden. Dabei wird vor allem die Degradierung und weniger die verminderte Synthese als treibende Kraft hinter dem reduzierten Kollagengehalt angenommen (Lee *et al.* 2014). Dies könnte ebenfalls auf eine erhöhte tatsächliche Kollagenkonzentration in den BAV-Gruppen schließen lassen. Weiterhin spricht das signifikant vermehrte Auftreten von KHK bei den

BAV-Gruppen dafür, insbesondere bei der BAV-2-Gruppe. Bei Patienten mit Myokardinfarkt konnte ein verminderter Gehalt an Kollagen III in der Aorta festgestellt werden. Dies könnte einerseits für die erhöhte Instabilität und Verletzbarkeit von arteriosklerotischen Plaques sprechen (Kong *et al.* 2013). Andererseits würde es die erhaltenen Ergebnisse der nur leicht erhöhten Kollagenkonzentration in der BAV-2-Gruppe erklären. Der signifikante Unterschied der Patientenpopulation beim Parameter Diabetes hat hingegen keine entscheidenden Auswirkungen auf die Kollagenkonzentration. So konnten bei einer Studie mit Ratten keine signifikanten Veränderungen von Kollagen bei diabetischen gegenüber nicht-diabetischen Aorten festgestellt werden (Akhtar *et al.* 2014). Weiterhin konnte sowohl bei der Aortenklappenstenose (Huang und Le Tan 2014; Kidher *et al.* 2014), als auch bei der Aortenklappeninsuffizienz kein Nachweis eines Einflusses auf die Steifigkeit der Aorta geliefert werden (Huang und Le Tan 2014).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gehen mit den Arbeiten verschiedener Autoren konform, die Elastin als Hauptbestandteil der EZM der Aorta identifiziert haben (Cheheltani *et al.* 2014; Halper und Kjaer 2014). Dabei konnten in dieser Arbeit ca. 1,5-fach erhöhte Elastinkonzentrationen gegenüber den Kollagenkonzentrationen ermittelt werden. In der vorliegenden Arbeit zeigten die Elastinkonzentrationen der BAV- und TAV-Gruppen jedoch keine signifikanten Unterschiede auf. Diese Ergebnisse konnten durch eine Arbeit von Phillippi *et al.* bestätigt werden, die die Aorten von BAV- und TAV-Patienten bezüglich ihrer Matrixzusammensetzung der *Media* untersuchten. Dabei konnten sie keine Unterschiede in der α -Elastinkonzentration zwischen den untersuchten BAV- und TAV-Patientengruppen nachweisen (Phillippi *et al.* 2014).

Die elastischen Fasern entfalten sich schnell bei beginnender mechanischer Belastung (Samila und Carter 1981). Damit sorgen sie für die elastischen Eigenschaften, die in arteriellen Gefäßen und insbesondere in der Aorta notwendig sind. Durch die vergleichbaren Elastinkonzentrationen können die Ergebnisse der Arbeit von Ferrara *et al.* bestätigt werden, die keinen Unterschied im niedrigen E-Modul zwischen BAV- und TAV-Patienten ausmachen konnten (Ferrara *et al.* 2018). Das niedrige E-Modul ist hierbei definiert als Elastin-

dominierte Reaktion des Aortengewebes auf geringe mechanische Belastung (Azadani *et al.* 2012; Kobielarz *et al.* 2015).

Die altersabhängig zunehmende Steifigkeit von arteriellen Gefäßen und der Aorta ist unter anderem durch die Abnahme der Elastinkonzentration mit zunehmendem Alter erklärbar (Myers und Lang 1946; Faber und Møller-Hou 1952). Jedoch konnten aktuelle Studien keinen Unterschied in der Steifigkeit bei Verminderung der Elastinkonzentration feststellen (Kochová *et al.* 2012). Bei BAV-Patienten zeigte sich eine vermehrte Fragmentierung elastischer Fasern (Haunschild *et al.* 2017). Weiterhin konnte eine vermehrte Fragmentierung bei zunehmendem Alter (Schlatmann und Becker 1977) und arterieller Hypertonie (Sans und Moragas 1993) entdeckt werden. Ein Resultat dieser Fragmentierung stellen die sogenannten löslichen Elastinfragmente (sELAF) dar. Diese werden durch proteolytische Prozesse infolge von Inflammation ins Blut abgegeben. Über ihre Konzentration können Aussagen zum Zustand des entstandenen falschen Lumens bei einer Dissektion gemacht werden (Segreto *et al.* 2014). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Steifigkeit des Elastins mit zunehmender Kalzifizierung und vermehrtem Cross-Linking durch AGEs steigt (Greenwald 2007). Dafür sprechen insbesondere die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die eine signifikante Erhöhung der Kalzifizierung der BAV-Aorten (vgl. Kapitel 6.2.3) aufzeigten. Des Weiteren konnte die eigene Arbeitsgruppe im Rahmen einer anderen Promotion (Frau Linda Heiser) erhöhte Expressionen von AGE in den Aorten von BAV-Patienten nachweisen. Diese Veränderungen des Proteins Elastin können zu einer unkontrollierten Proliferation glatter Muskelzellen in der Gefäßwand führen (El-Hamamsy und Yacoub 2009), die wiederum einen bedeutenden Einfluss auf die Steifigkeit der Aorta besitzen (Gao *et al.* 2014). Damit könnte die erhöhte Steifigkeit der BAV-Gruppen bei vergleichbaren Konzentrationen von Elastin erklärt werden.

In vorangegangenen Arbeiten konnte bei dissezierten Aorten ein verminderter Elastingehalt identifiziert werden (Tsamis *et al.* 2013; Yamada *et al.* 2015). Dabei konnte eine erhöhte Dehnbarkeit bei gleichzeitig verminderter Elastinkonzentration nachgewiesen werden (Yamada *et al.* 2015). Die verminderte Elastinkonzentration korrelierte mit einer verminderten Expression von Fibulin-5, das ein Bestandteil der Bildung von Elastin darstellt. Durch die

verminderte Expression des Fibulin-5 könnte es zur einer veränderten Zusammensetzung des Elastins kommen, das möglicherweise eine Erklärung für die erhöhte Empfänglichkeit der Aortenwand für Dissektionen sein könnte (Tsamis *et al.* 2013). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Degradierung von Elastin weniger an der Dilatation und Gefäßruptur von Aorten beteiligt ist, als die Degradierung von Kollagen (Dobrin und Mrkvicka 1994).

Eine Arbeit von Lee *et al.* konnte eine vergleichbare Elastinfragmentierung bei männlichen und weiblichen BAV-Patienten mit thorakalem Aortenaneurysma feststellen (Lee *et al.* 2014). Damit verliert der Unterschied in der Patientenpopulation bezüglich des Geschlechts an Relevanz. Auch die signifikanten Unterschiede in der Prävalenz von Diabetes sind zu vernachlässigen. So zeigten sich in einer Studie von Akhtar *et al.* keine signifikanten Veränderungen von Elastin bei diabetischen Aorten gegenüber der nicht-diabetischen Kontrollgruppe. Jedoch konnte eine erhöhte Proteaseaktivität in der EZM entdeckt werden, die eine erhöhte Fragmentierung und Veränderung des Elastinbestandteils Fibrillin zur Folge hatte (Akhtar *et al.* 2014). Weiterhin konnte eine Unabhängigkeit der Elastinkonzentration von dem Krankheitsbild der KHK bestätigt werden (Kong *et al.* 2013).

Aus den hier genannten Fakten lässt sich schließen, dass Elastin ein Faktor für die Entstehung von Aortendissektionen sein könnte. Jedoch stellt insbesondere die Fragmentierung elastischer Fasern einen weiteren Faktor dar, der in dieser Arbeit nicht quantifiziert wurde, aber von großem Interesse ist. Im nächsten Schritt kann nun die Beurteilung der elastischen Fasern und ihrer Fragmentierung erfolgen, die unabhängig von der Elastinkonzentration weitere Hinweise auf die biomechanischen Eigenschaften der untersuchten Aorten liefern könnte.

Die nicht gerissenen Aortenproben zeigten erhöhte Mittelwerte des Elastizitätsmoduls gegenüber der Mehrheit der BAV-Proben (BAV-1) und der TAV-Gruppe. Jedoch waren diese niedriger als die BAV-Subgruppe (BAV-2). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass weder eine hohe Steifigkeit, noch eine niedrige Steifigkeit des Gewebes protektiv auf die Reißfestigkeit der Aorta einwirken. Es scheint, dass eher ein ausgewogenes Verhältnis aus steifen und

elastischen Anteilen die Reißfestigkeit der Aorta erhöht. Aus diesen Ergebnissen könnte geschlussfolgert werden, dass ein Missverhältnis zwischen elastischen und steifen Anteilen die Reißanfälligkeit der Aorta erhöhen könnte.

Die Konzentrationen der Glykosaminglykane der konvexen Seiten zeigten eine Verminderung in der BAV-2-Gruppe gegenüber der BAV-1- und TAV-Gruppe. Eine Studie von Mattson *et al.* untersuchte die Aorta von Schweinen vor und nach enzymatischer GAG-Entfernung. Dabei stellten sie keine Veränderung in der Steifigkeit des Gewebes fest (Mattson *et al.* 2017). Diese Erkenntnisse bestätigen die hier dargestellten GAG-Ergebnisse.

Weiterhin werden die hier vorgestellten Ergebnisse durch exemplarische Histologien unterstützt. So konnten keine vermehrten Clusterbildungen oder Umverteilungen der Hyaluronsäure oder der GAGs festgestellt werden. Jedoch zeigten die Histologien der gestretchten, aber nicht gerissenen Aortenpräparate eine aufgelockerte Struktur vor dem Zugversuch. Nach dem Zugversuch präsentierten sich die entsprechenden Präparate in kompakter und dichter Struktur ohne die vorher beschriebenen Auflockerungen. Jedoch konnten kleine Einrisse innerhalb der *Media* beobachtet werden, die möglicherweise Prädilektionsstellen für eine spätere Dissektion darstellen könnten. Weiterhin konnte insbesondere bei den gerissenen Präparaten ein tiefer Einriss in die *Media* der Aortenwand, oftmals mit begleitender Kalzifizierung des umgebenden Gewebes beobachtet werden.

Weitere Untersuchungen der biomechanischen Eigenschaften der Aorta könnten zusätzliche Zugversuche in longitudinaler Richtung inkludieren. Diese könnten Hinweise auf das Verhalten der Gewebeproben auf mechanische Belastung liefern, die weitestgehend unabhängig von dem maßgeblich bestimmenden Faktor der Konzentration und Ausrichtung von Kollagen in der Gefäßwand sind. So konnte in einer Studie von Li *et al.* festgestellt werden, dass in menschlichen Karotiden eine Abnahme des longitudinalen Elastizitätsmoduls das Risiko für die Aneurysmabildung erhöhen könnte (Li *et al.* 2016). Im nächsten Schritt steht die Evaluation von weiteren Eigenschaften des untersuchten Aortengewebes an. So könnten Relaxationstests zusätzliche Hinweise über die Homo- bzw. Heterogenität des Gewebes liefern (Davis und Vita 2012). Weiterhin könnten

zyklische Belastungstests Informationen über das Verhalten der Aortenproben nach mehrmaliger Belastung liefern. So zeigt sich bei biologischen Proben eine stetige Erhöhung des E-Moduls durch das so genannte *Strain Hardening*. Dies ist ein Schutzmechanismus, der bei dauerhafter und hoher Belastung das Gewebe vor dem Zerfall schützt und seine Funktionalität erhält (Chintapalli *et al.* 2014). Von besonderem Interesse sind die Aortenproben, die das Stretching durchlaufen haben und nicht gerissen sind. Anhand dieser Proben könnten protektive Faktoren erforscht werden, die eine weitere Unterscheidung zwischen Niedrig- und Hochrisikopatienten erbringen und gegebenenfalls nicht notwendige Operationen bei diesen Patienten verhindern könnten. Dies könnte beispielsweise durch die Untersuchung des Verhältnisses zwischen elastischen (Elastin) und steifen (Kollagen) Anteilen erbracht werden.

6.1.2 Untersuchung anhand des Aortendurchmessers

Der Einfluss des Aortendurchmessers auf die mechanischen Eigenschaften und die EZM-Zusammensetzung der Aorten der BAV- und TAV-Gruppe wurde anhand ihres Durchmessers analysiert, um diesen aktuell bedeutendsten Risikofaktor und Indikator für mögliche Aortendissektionen zu beurteilen (Elefteriades 2010). Es wurden 55 Millimeter als Trenngröße der Untergruppen definiert. Diese Trenngröße wurde gemäß den ESC-Leitlinien von 2014 bestimmt, da die Indikation für einen operativen Ersatz der *Aorta ascendens* für Aneurysmen bei bikuspiden und trikuspiden Aortenklappen ohne Risikofaktoren bei Durchmessern ≥ 55 Millimetern gestellt wird (Erbel *et al.* 2014). Weitere Autoren empfehlen eine operative Intervention bei BAV-Patienten bereits bei Durchmessern ≥ 50 Millimetern (Etz *et al.* 2012). Vor dem Hintergrund einer Dissektionsrate von 0,4 – 5 % bei BAV-Patienten (Ward 2000; Guntheroth 2008; Michelena *et al.* 2008; Tzemos *et al.* 2008; Masri *et al.* 2017) sollte diese Unterteilung jedoch die Hochrisikopatienten, insbesondere unter den BAV-Patienten gruppieren. Weiterhin wird dadurch die bessere Vergleichbarkeit zur TAV-Gruppe gewährleistet, da die Trenngröße für beide Gruppen gleich gewählt werden konnte.

Lediglich bei den konkaven Seiten der BAV-Gruppe < 55 Millimeter konnte ein signifikant erhöhter Mittelwert der E-Module gegenüber der TAV-Gruppe < 55 Millimeter ermittelt werden. Die E-Module der anderen Untergruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Eine Studie von Babu *et al.* konnte eine erhöhte Steifigkeit von disseziertem Aortengewebe nachweisen. Die Steifigkeit korrelierte dabei jedoch nicht mit erhöhten Durchmessern der *Aorta ascendens* (Babu *et al.* 2015). Diese Ergebnisse bestätigen die Analysen der vorliegenden Arbeit, da auch hier kein Zusammenhang zwischen dem E-Modul bzw. der Steifigkeit der Aortenproben und dem Aortendurchmesser erkennbar war. Weiterhin bekräftigen diese Ergebnisse die Notwendigkeit weitere Parameter zu identifizieren, die größenunabhängig das Dissektionsrisiko von Aortenaneurysmen bestimmen können.

In den konkaven Seiten der BAV-Gruppe mit Durchmessern ≥ 55 Millimetern konnten signifikant verminderte Konzentrationen an Kollagen gegenüber der BAV-Gruppe mit Durchmessern < 55 Millimetern festgestellt werden. Eine Studie von Whittle *et al.* unterstützt die hier vorgestellten Ergebnisse. So wurden bei dissezierten Aorten, insbesondere an der Dissektionsstelle, verminderte Konzentrationen an Kollagen festgestellt. Weiterhin stellten sie strukturelle Veränderungen in der EZM der Aorta fest. Dabei kam es zur Zunahme von Proteinen und weiteren Molekülen, während die physiologische Zusammensetzung der EZM verändert wurde (Whittle *et al.* 1990). Die hier dargestellte Abnahme von Kollagen bei der BAV-Gruppe mit Durchmessern ≥ 55 Millimetern könnte mit der Zunahme an anderen Bestandteilen innerhalb der Aortenwand erklärbar sein. So zeigte sich eine erhöhte Konzentration an Glykosaminoglykanen in den konkaven Seiten der BAV-Gruppe mit Durchmessern ≥ 55 Millimetern gegenüber der BAV-Gruppe mit Durchmessern < 55 Millimetern.

Eine mögliche Erklärung für das erhöhte Dissektionsrisiko bei BAV-Patienten mit Aortenaneurysmen könnten die ermittelten Konzentrationen der Hyaluronsäure in den Untergruppen liefern. So zeigten sich signifikant erhöhte Hyaluronsäure-Konzentrationen der konvexen Seiten in der BAV-Gruppe ≥ 55 Millimetern gegenüber der BAV-Gruppe < 55 Millimetern und der TAV-Gruppe ≥ 55 Millimetern. Innerhalb der TAV-Gruppe konnte ein gegensätzliches Bild gezeichnet werden. So ist die Hyaluronsäure-Konzentration der TAV-Gruppe ≥ 55 Millimetern signifikant niedriger verglichen mit der TAV-Gruppe < 55 Millimetern.

Die Hyaluronsäure stellt das einzige nicht-sulfatierte Glykosaminoglykan dar. Es bildet stark hydratisierte Gele und ist an diversen Krankheits- und Heilungsprozessen beteiligt. So sorgt sie für eine Verbesserung der Wundheilung und wirkt als Sauerstoffradikalfänger, ist jedoch auch an der Pathogenese der Metastasierung beteiligt (Heinrich *et al.* 2014). In der EZM ist die Hyaluronsäure Bestandteil eines hydratisierten Gels, in das die elastischen und kollagenösen Fasern eingebettet sind (Niwa *et al.* 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die GAG inklusive der Hyaluronsäure einen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der Aorta haben. So wurde bei enzymatischer Entfernung von

GAG aus dem Aortengewebe von Schweinen eine frühzeitigere Rekrutierung von elastischen und kollagenösen Fasern nachgewiesen (Mattson *et al.* 2017). Während Mattson *et al.* jedoch keine Unterschiede in der Steifigkeit des Aortengewebes vor und nach der GAG-Entfernung bestimmen konnten, zeigte eine Studie von Lorentzen *et al.* gegenteilige Ergebnisse. Hierbei führte eine vermehrte Akkumulation der Hyaluronsäure sowohl zu einer vermehrten Gefäßstärke und Atherosklerose, als auch zu einer erhöhten Steifigkeit des betroffenen Gefäßes (Lorentzen *et al.* 2016). Bringt man die erhöhte Steifigkeit des Gefäßes durch vermehrte Hyaluronsäureakkumulation in Verbindung mit der bereits vorgestellten Studie zur erhöhten Steifigkeit dissezierter Aorten (Babu *et al.* 2015), so könnte die Akkumulation der Hyaluronsäure kausal mit der Entstehung von Aortendissektionen zusammenhängen. Diese Vermutung bestätigt eine Studie von Roccabianca *et al.*, die den Einfluss von GAG-Clusterbildung in der *Media* von Aorten auf die biomechanischen Eigenschaften untersuchten. Die thorakalen Aortenaneurysmen wiesen demnach die Clusterbildung von GAG in der Aortenmedia als Alleinstellungsmerkmal gegenüber abdominellen und zerebralen Aneurysmen auf. Da insbesondere die thorakalen Aortenaneurysmen von Dissektionen betroffen sind wurde hier der Zusammenhang zwischen der Clusterbildung von GAG und einem erhöhten Dissektionsrisiko hergestellt. Durch die Clusterbildung kommt es konsekutiv zu einer *Donnan-Schwellung*, die eine Dissektion begünstigen oder sogar initiieren könnte. Die *Donnan-Schwellung* entsteht dabei durch die negativ geladenen Sulfonyl- und Carbonylgruppen der GAGs, denen osmotisch Wasser folgt (Roccabianca *et al.* 2014b). Die Hyaluronsäure könnte demnach durch ihre hohen wasserbindenden Eigenschaften (Roccabianca *et al.* 2014a) an der Entstehung der Aortendissektion beteiligt sein. Aus diesem Zusammenhang heraus könnten die signifikant erhöhten Hyaluronsäurekonzentrationen, insbesondere in der BAV-Gruppe mit einem Aortendurchmesser ≥ 55 Millimeter, eine mögliche Ursache für das erhöhte Dissektionsrisiko bei BAV-Patienten darstellen. Diese Ergebnisse bekräftigen den aktuellen Ansatz den Aortendurchmesser als entscheidendes Kriterium für die Operationsindikation zu belassen und bereits bei geringeren Durchmessern zu operieren.

Im Gegensatz zu vorangegangenen Arbeiten, die eine Zunahme der Hyaluronsäure in Aortengewebe mit zunehmendem Alter beobachten konnten (Antov 1975; Chajara *et al.* 1998), wurden in der TAV-Gruppe mit Durchmessern ≥ 55 Millimetern signifikant verminderte Hyaluronsäure-Konzentrationen ermittelt. Dies widerspricht den oben genannten Arbeiten, da in der TAV-Gruppe mit Durchmessern ≥ 55 Millimetern signifikant erhöhte Mittelwerte im Alter der Patienten zu sehen sind. Eine mögliche Erklärung liegt in den signifikant erhöhten Aortendurchmessern der TAV-Gruppe mit Durchmessern ≥ 55 Millimetern. Da die Vergrößerung im Aortendurchmesser mit einer zunehmenden Zerstörung der extrazellulären Matrix assoziiert ist (Cheheltani *et al.* 2014), könnten die deutlich erhöhten Mittelwerte im Aortendurchmesser eine Erklärung für die erniedrigte Hyaluronsäurekonzentration sein.

Von besonderem Interesse ist die weitere Evaluation der Clusterbildung und Verteilung der Hyaluronsäure in der Aortenwand. Dies könnte die ermittelten Ergebnisse bestätigen und möglicherweise einen Parameter etablieren, anhand dessen das Dissektionsrisiko beschrieben und die Operationsindikation individuell gestellt werden kann.

6.2 Diskussion der Bestandteile der Aortenwand

Zur Bestätigung der Unabhängigkeit der Ergebnisse des biomechanischen Stretchings und der zugehörigen EZM-Bestandteile wurde eine separate Patientenpopulation auf ihre Bestandteile der Aortenwand untersucht. Es konnten dabei keine signifikanten Unterschiede in dem Großteil der relevanten Parameter (Geschlecht, Alter, Rauchen, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, koronare Herzkrankheit, Durchmesser der *Aorta ascendens*) festgestellt werden. Lediglich bei den Klappenvitien zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. So konnte eine signifikant erhöhte Anzahl an Aortenklappenstenosen bei den BAV-Patienten nachgewiesen werden. Dies geht konform mit Studien, die ein erhöhtes Risiko der Aortenklappenstenose bei Anlage einer bikuspiden Aortenklappe identifizieren konnten (Mills *et al.* 1978; Siu und Silversides 2010; Jackson *et al.* 2014). Weiterhin zeigte sich eine signifikant erhöhte Anzahl an Aortenklappeninsuffizienzen in der TAV-Gruppe. Dies könnte über die Dilatation der Aorta und der damit verbundenen Beeinträchtigung des Aortenklappenschlusses erklärt werden (Pethig *et al.* 1998).

6.2.1 Untersuchung von Elastin und Kollagen

Die Elastinkonzentrationen der untersuchten Patientenpopulation zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen BAV- und TAV-Patienten auf. Damit bestätigen sich die Ergebnisse der Elastinkonzentrationen der gestreckten Aortenproben. Weiterhin gehen die Ergebnisse mit verschiedenen Studien konform, die ebenfalls keine Unterschiede zwischen den BAV- und TAV-Gruppen bezüglich der Elastinkonzentration feststellen konnten (Fedak *et al.* 2003; Phillippi *et al.* 2014)

Anders erscheint das Verhalten der Kollagenkonzentration. So konnten in den konvexen Seiten signifikant erhöhte Kollagenkonzentrationen in der BAV- gegenüber der TAV-Gruppe nachgewiesen werden. Dies wird bestätigt durch Studien, die ebenfalls erhöhte Mittelwerte in den Kollagenkonzentrationen bei BAV-Patienten aufzeigten (Choudhury *et al.* 2009). Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der Arbeit von Pichamuthu *et al.*, die vergleichbare Konzentrationen von Kollagen zwischen BAV- und TAV-Patienten nachweisen konnten (Pichamuthu *et al.* 2013). Eine mögliche Erklärung könnte in der Patientenpopulation der Studie von Pichamuthu *et al.* liegen, die einen signifikant erhöhten Altersdurchschnitt der TAV-Patienten aufwies. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Kollagenkonzentration der TAV-Patienten als zu hoch angenommen wurde, da mit zunehmendem Alter die Kollagenkonzentration in der Aorta zunimmt (Myers und Lang 1946; Schlatmann und Becker 1977; Sans und Moragas 1993). Die hier ermittelten Ergebnisse unterstützen insbesondere die Untersuchungsergebnisse des erhöhten kollagenassoziierten Elastizitätsmoduls der BAV-2-Gruppe. Dabei verstärken sie den Eindruck, dass Kollagen BAV-spezifisch an der Pathogenese von Aortendissektionen beteiligt ist und weiterführender Erforschung bedarf.

6.2.2 Untersuchung der Hyaluronsäure, GAG und Biglycan

Die Ergebnisse der Hyaluronsäurekonzentration konnten erhöhte Werte in den konkaven und konvexen Seiten der BAV- gegenüber der TAV-Gruppe aufzeigen, die sich jedoch nicht signifikant unterschieden. Damit zeigten sie die tendenziell vermehrte Hyaluronsäureakkumulation in den Aorten von Patienten mit bikuspiden Aortenklappen auf und unterstützten die Untersuchungsergebnisse zur Hyaluronsäurekonzentration der nach dem Durchmesser sortierten Aorten. Jedoch konnten in den histologischen Auswertungen keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung oder Clusterbildung der Hyaluronsäure im Vergleich der BAV- zur TAV-Gruppe nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse korrelieren mit einer Studie von Gutierrez *et al.*, die ähnliche Verteilungen von Hyaluronsäure und Biglycan in der Aortenwand feststellen konnten (Gutierrez *et al.* 1998). Eine mögliche Erklärung ergibt sich aus den Untersuchungsergebnissen anhand des Aortendurchmessers. So könnte die Clusterbildung der Hyaluronsäure eng mit der Zunahme des Aortendurchmessers verknüpft sein, wie die erhöhten Konzentrationen bei der BAV-Gruppe mit Durchmessern ≥ 55 Millimetern zeigen. Aus den gewonnenen Erkenntnissen lässt sich schließen, dass die Hyaluronsäure eine mögliche Ursache für die erhöhte Dissektionsrate bei Patienten mit bikuspiden Klappen, insbesondere mit vergrößerten Aortendurchmessern darstellt.

Die Ergebnisse der GAG-Konzentration konnte ebenfalls erhöhte Werte in den konkaven und konvexen Seiten der BAV- gegenüber der TAV-Gruppe nachweisen. Diese unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die vergleichbaren Konzentrationen konnten zusätzlich in den Untersuchungen anhand des Elastizitätsmoduls und Aortendurchmessers bestätigt werden. Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die GAG in der Pathogenese der Aneurysmabildung und Aortendissektion in Bezug auf ihre Konzentration eine untergeordnete Rolle spielen.

Die Ergebnisse der Biglycanexpression zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen der BAV- und TAV-Gruppe. Proteoglykane wie Biglycan sind neben ihrer Bedeutung für die Gefäßstruktur für die Entwicklung von Atherosklerose verantwortlich. Dabei sind sie sowohl an der Organisation der EZM-Bestandteile,

als auch an der Bindung und Zurückhaltung von Apolipoprotein-B enthaltenden Lipoproteinen beteiligt. Aufgrund dieser beiden Funktionen konnte eine Studie von Tang *et al.* eine erhöhte Neigung zur Entwicklung von Aortenaneurysmen und Atherosklerose bei Biglycan-Defizienz nachweisen. In diesem Zusammenhang zeigten die untersuchten Präparate aufgelockerte Kollagenfasern und eine erhöhte Belastungsanfälligkeit der Elastinfasern durch Angiotensin II (Tang *et al.* 2014). Diese Ergebnisse werden bestätigt durch diverse Studien, die Zusammenhänge zwischen der verminderten Expression von Biglycan und dem erhöhten Risiko der Aneurysmabildung und Aortendissektion herstellen konnten (Tamarina *et al.* 1998; Theocharis und Karamanos 2002; Heegaard *et al.* 2007). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Biglycan zwar einen Einfluss auf die Pathogenese der Aneurysmabildung und Dissektion besitzt, dieser jedoch nicht in besonderem Maße mit der Anlage einer bikuspiden Aortenklappe assoziiert ist.

6.2.3 Untersuchung von Wanddicke und Kalzifizierung

Die Bestimmung der Wanddicke zeigte signifikant verminderte Dicken der *Tunica intima* der BAV-Gruppe sowohl in den konkaven, als auch konvexen Seiten. Diese Arbeit bestätigt damit die Ergebnisse von Studien, die ebenfalls geringere Intimadicken bei BAV-Patienten nachweisen konnten (Pham *et al.* 2013; Grewal *et al.* 2014). Eine mögliche Erklärung für die erhöhten Intimadicken der TAV-Patienten könnte sich auf das tendenziell erhöhte Alter und die Prävalenz der KHK zurückführen lassen. So kann mit zunehmendem Alter das vermehrte Auftreten von Atherosklerose beobachtet werden (Tunstall-Pedoe 2003). Diese Erkrankung kann maßgeblich zur Verdickung der *Intima* beitragen (Weissberg 1999; Tousoulis *et al.* 2011).

In der vorliegenden Arbeit konnten weiterhin signifikant erhöhte Gesamt- und Mediadicken der konkaven Seiten gegenüber den konvexen Seiten, sowohl in der BAV-, als auch in der TAV-Gruppe nachgewiesen werden. Damit bestätigen sich die Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe, die ebenfalls eine erhöhte Mediadicke der konkaven Seiten feststellen konnten (Haunschild *et al.* 2017). Weiterhin konnte eine signifikant verminderte Gesamtdicke der konvexen Seiten der BAV-Gruppe gegenüber der TAV-Gruppe ausgemacht werden. Diese Ergebnisse gehen konform mit einer Arbeit von Choudhury *et al.*, die ebenfalls verminderte Dicken der Aortenwand von BAV-Patienten ermittelte (Choudhury *et al.* 2009). Jedoch zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse in den Mediadicken zwischen BAV- und TAV-Gruppe zu der eigenen Arbeitsgruppe. So konnte in dieser Arbeit kein Unterschied in der Mediadicke zwischen der BAV- und TAV-Gruppe festgestellt werden, während die Studie von Haunschild *et al.* erniedrigte Mediadicken der BAV-Gruppen konstatierte (Haunschild *et al.* 2017). Eine mögliche Erklärung liegt in der erhöhten Prävalenz an Patienten mit arterieller Hypertonie in der TAV-Gruppe bei der Studie von Haunschild *et al.* So konnten erhöhte Mediadicken der Aorta bei begleitender arterieller Hypertonie nachgewiesen werden (Taghizadeh *et al.* 2015). Weiterhin könnte dies durch die Intimadicken der TAV-Gruppe erklärt werden. So konnten Tang *et al.* bereits kompensatorische Intimaverdickungen bei erniedrigten Mediadicken in thorakalen Aortenaneurysmen nachweisen (Tang *et al.* 2005). Ein limitierender Faktor der Untersuchung der Wanddicke stellt die Prävalenz der

Aortenklappeninsuffizienz, sowohl in der Untersuchung von Haunschild *et al.*, als auch der eigenen Untersuchung dar. Die signifikant erhöhte Prävalenz der Aortenklappeninsuffizienz kann maßgeblich für die erhöhte Media- und Gesamtdicke der Aorta verantwortlich sein (Benedik *et al.* 2014).

Vorangegangene Studien konnten zeigen, dass die mechanische Belastung mit zunehmender Ausdünnung der Gefäßwand ansteigt. Außerdem werden die konvexen Seiten durch hämodynamische Einflüsse zusätzlich belastet (Choudhury *et al.* 2009). Weiterhin zeigen die einzelnen Schichten der Aortenwand im Tierversuch unterschiedliche biomechanische Eigenschaften wie eine erhöhte Steifigkeit der *Tunica intima* und *Tunica adventitia* gegenüber den entsprechenden Mediaanteilen (Peña *et al.* 2015). Zudem konnten die unterschiedlichen Reaktionen der einzelnen Schichten auf mechanische Belastung bewiesen werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein bzw. Fehlen der *Tunica intima* einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Belastung von *Tunica media* und *Tunica adventitia* aufzeigt (Holzapfel und Ogden 2010). Daraus lässt sich schließen, dass die tendenziell erhöhte Steifigkeit der BAV-Aorten bei gleichzeitig verminderter Intimadicke am ehesten auf Veränderungen der *Tunica media* zurückzuführen ist. Die Dicke der Aortenwand und seiner einzelnen Schichten kann somit als eine weitere potenzielle Ursache für die Aortendissektion bei BAV-Patienten ausgemacht werden. Dies konnte durch die aufgezeigten signifikant erniedrigten Dicken der *Tunica intima* und konvexen Gesamtdicke der BAV-Seiten und der generellen Ausdünnung der konvexen gegenüber den konkaven Seiten aufgezeigt werden.

Weiterhin wurde die Kalzifizierung der Aortenproben bestimmt. Dabei konnten in dieser Arbeit signifikant erhöhte Kalzifizierungen sowohl in den konkaven, als auch in den konvexen Seiten der BAV-Gruppe gegenüber der TAV-Gruppe ermittelt werden. Diese Ergebnisse gehen mit Studien der eigenen Arbeitsgruppe konform, die ebenfalls vermehrte Kalzifizierungen in der BAV-Gruppe feststellen konnten (Haunschild *et al.* 2017). Auch die erhöhte Expression von AGE bei BAV-Patienten unterstützen diese Beobachtung, da es bei erhöhten AGE-Leveln zu einer vermehrten Kalzifizierung von Gefäßwänden kommt (Brodeur *et al.* 2014). Der Kern dieser Kalzifizierung könnte dabei von Phospholipiden und Proteoglykanen gebildet werden (Kim 1976). Die Korrelation zwischen

Kalzifizierung und GAG bzw. Proteoglykanen konnte jedoch in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Die Kalzifizierung der Aorta wird als mögliche Ursache der erhöhten Steifigkeit der Aortenwand diskutiert (Mohr und Görz 2001; Kwon *et al.* 2011; Kurugol *et al.* 2015; Haunschild *et al.* 2017). Dabei verändert sie die Struktur der Aortenwand über die Zusammenlagerung zwischen den elastischen *Laminae* (Mohr und Görz 2001) und die Degradierung glatter Muskelzellen (Tanimura *et al.* 1986). Insbesondere die physiologisch dichte Anordnung der elastischen Fasern wird als maßgeblich für die *Compliance* der Aorta verantwortlich gemacht (Azadani *et al.* 2012). Vor dem Hintergrund der Auflösung der dichten Struktur der elastischen Fasern und erhöhten Steifigkeit der Aorta könnte die Kalzifizierung somit ebenfalls zu einer erhöhten Dissektionsrate bei BAV-Patienten beitragen (Babu *et al.* 2015).

6.3 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurden die biomechanischen Eigenschaften von Aorten bei BAV-Patienten untersucht. Es zeigte sich in einer Untergruppe der Patienten mit BAV (BAV-2) eine signifikant erhöhte Steifigkeit, welche mit erhöhten Konzentrationen an Kollagen assoziiert war. Dies konnte in einer unabhängigen Untersuchung einer größeren Patientenpopulation mit signifikant erhöhten Kollagenkonzentrationen bestätigt werden und weist auf eine besondere Rolle des Kollagens in der Pathogenese der Aneurysmabildung und potenziellen Dissektionsentstehung hin. Dies könnte insbesondere durch ein Missverhältnis von elastischen und steifen Anteilen in der Aortenwand erklärt werden. Die vergleichbaren Elastizitätsmodule der BAV-1- und TAV-Gruppe könnten eine Erklärung für die erhöhte Reißanfälligkeit beider Gruppen sein, die in der Verringerung steifer Anteile begründet liegt.

Weiterhin konnten die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass es zu einer erhöhten Hyaluronsäurekonzentration bei Durchmessern der Aorta ≥ 55 Millimetern bei BAV-Patienten kommt. Zwar kann die Hyaluronsäure die Steifigkeit des Gewebes erhöhen, jedoch konnten in dieser Arbeit keine direkten signifikanten Zusammenhänge zwischen der Hyaluronsäurekonzentration und Gewebesteifigkeit festgestellt werden. Vielmehr steht die Rolle der Hyaluronsäure als osmotisch wirksames Glykosaminoglykan im Vordergrund, das über einen Wassereinstrom und die damit verbundene *Donnan-Schwellung* das Dissektionsrisiko erhöhen könnte. Im Zusammenspiel mit dem erhöhten Dissektionsrisiko bei erhöhten Aortendurchmessern lässt sich eine für die Aortendisektion bei BAV-Patienten ursächliche oder begünstigende Rolle der Hyaluronsäure vermuten.

Im Zusammenhang mit dem Remodeling und der Zerstörung der Struktur und EZM der Aortenwand konnten Veränderungen in der Dicke und dem Kalzifizierungsgrad bestimmt werden. Der erhöhte Kalzifizierungsgrad der BAV-Präparate könnte ein weiterer Grund für die BAV-spezifisch erhöhte Steifigkeit der untersuchten Aortenproben sein. Diese Ergebnisse bestätigen den Eindruck von der Komplexität und Multikausalität des Krankheitsbildes der Aortendisektion bei Patienten mit bikuspiden Aortenklappen.

6.4 Limitationen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gewebeproben der Aorta von BAV- und TAV-Patienten untersucht. In die Studie zum Stretching der Aortenproben wurden alle Patienten eingeschlossen, die einen operativen proximalen Aortenersatz erhielten und der Teilnahme an der Studie zustimmten. Dadurch konnte einerseits nicht die gleiche Anzahl an BAV- und TAV-Patienten und andererseits keine Unabhängigkeit von Parametern wie dem Geschlecht, Alter, Rauchen, Diabetes mellitus, der arteriellen Hypertonie, koronaren Herzkrankheit und dem Durchmesser der *Aorta ascendens* gewährleistet werden.

Des Weiteren wurden die Gewebeproben bei dem biomechanischen Stretching vorwiegend in zirkumferentieller Richtung auf Belastung untersucht, in Übereinstimmung mit der Richtung der Kollagenfasern. Ein zusätzliches Stretching der Gewebeproben in longitudinaler Richtung zur Ergänzung ist als sinnvoll anzusehen. Jedoch konnte vor allem bei den konkaven Seiten in den meisten Fällen nur ein zirkumferentielles Stück für das Stretching entnommen werden, da die zur Verfügung gestellte Aortenprobe nicht genug Material für ein longitudinales Präparat enthielt.

Eine weitere Einschränkung wurde in den kleinen Stichprobengrößen, insbesondere bei der Unterteilung der Gruppen mit Durchmessern der *Aorta ascendens* ≥ 55 Millimetern deutlich. Dies kann durch die Leitlinien erklärt werden, die bei symptomatischen BAV-Patienten einen Klappen- mit begleitendem Aortenersatz bereits ab 45 Millimetern empfehlen (Nishimura *et al.* 2014). Bei symptomatischen TAV-Patienten wird die OP-Indikation in den Leitlinien bereits ab 50 Millimetern diskutiert (JCS Joint Working Group 2013).

Eine zusätzliche Limitation dieser Arbeit war das zum Teil sehr heterogene Probenmaterial. Insbesondere die Assays zur Quantifizierung der EZM-Bestandteile und der Western Blot erforderten biologisches Gewebe im Milligrammbereich. Durch die heterogene Verteilung von Kalzifizierungen und weiteren Pathologien an dem untersuchten Gewebe könnten so Verfälschungen aufgetreten sein.

Limitierend erweist sich zudem, dass keine gesunden Aortenproben als Kontrollgruppe zur Verfügung standen. Jedoch ist es ethisch nicht vertretbar, Aortengewebe von gesunden Personen zu gewinnen. Eine Möglichkeit für eine Kontrollgruppe wäre die Verwendung von gesundem Aortengewebe von Organspendern.

Auch die histologische Auswertung der Aortenpräparate des Stretchings erfolgte lediglich exemplarisch und soll als Ansatzpunkt für weiterführende Untersuchungen dienen. So konnten lediglich die Erkenntnisse einer geringen Stichprobe in die Bewertung einfließen. Ein umfassendes histologisches Aufarbeiten der Wanddicke, Kalzifizierung und Verteilung bzw. Clusterbildung der Hyaluronsäure könnte dahingehend weitere wichtige Informationen zu den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen liefern.

7 Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Titel: Charakterisierung der biomechanischen Eigenschaften und extrazellulären Matrix bei BAV-assoziierten Aortopathien

Eingereicht von: Clemens Cramer

Angefertigt am: Sächsischen Inkubator für klinische Translation (SIKT)

Herzchirurgie, Universität Leipzig

Philipp-Rosenthal-Str. 55

04103 Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. med. Christian D. Etz

Mitbetreuerin: Dr. med. Josephina Haunschild

Januar 2019

Hintergrund: Die bikuspidale Aortenklappe (BAV) stellt mit einer Prävalenz von 0,4 – 2 % die häufigste angeborene Fehlbildung des menschlichen Herzens dar (Roberts 1970; Ward 2000; Hoffman und Kaplan 2002; Tutar *et al.* 2005). Die Anlage einer BAV ist mit einem erhöhten Risiko der Aneurysmenbildung und Dissektion der *Aorta ascendens* verbunden (Fedak *et al.* 2002; Tzemos *et al.* 2008; Masri *et al.* 2017). Die Pathogenese der Aneurysmenbildung der *Aorta*

ascendens bei Patienten mit BAV beruht vorwiegend auf zwei Hypothesen. Einerseits wird die veränderte Hämodynamik als mögliche Ursache der Aneurysmenbildung diskutiert (Robicsek *et al.* 2004; Hope *et al.* 2010; Nathan *et al.* 2011), andererseits die genetische Komponente als grundlegender Faktor dargestellt (Nistri *et al.* 1999). Eine schwerwiegende Komplikation der BAV stellt in diesem Zusammenhang die akute Aortendissektion, Typ A dar. Diese kann bei 0,4 – 5 % der BAV-Patienten beobachtet werden (Ward 2000; Guntheroth 2008; Michelena *et al.* 2008; Tzemos *et al.* 2008; Masri *et al.* 2017). Die Mortalität der Erkrankung liegt dabei stündlich bei 1 – 2 % (Nienaber und Kodolitsch 1992). Als Indikator für ein erhöhtes Dissektionsrisiko wird nach aktuellem Stand vorwiegend der Aortendurchmesser herangezogen (Elefteriades 2010). Ein besonderes Interesse dieser Arbeit galt der vermehrten Zusammenlagerung von Glykosaminoglykanen in der *Tunica media* bei Aortendissektionen (Roccabianca *et al.* 2014b).

Fragestellung: Wie verhält sich das Aortengewebe von BAV-Patienten unter mechanischer Belastung? Lassen sich Rückschlüsse oder Zusammenhänge zur Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (EZM) erkennen? Können anhand dieser Untersuchungen mögliche Risikofaktoren und Prädiktoren für die Aortendissektion bei BAV-Patienten abgeleitet werden?

Methoden: Es wurden 35 Gewebeproben der *Aorta ascendens* von Patienten untersucht, die mit einem operativen Ersatz der *Aorta ascendens* therapiert wurden. Dabei wurden die Patienten anhand ihrer Klappenmorphologie in die BAV- oder TAV-Gruppe, sowie die konvexe (V) und konkave (K) Seite der *Aorta ascendens* eingeteilt. Ein biomechanischer Zugversuch wurde durchgeführt und anhand des Elastizitätsmoduls die Steifigkeit der Aortenproben bestimmt. Zur Vervollständigung dieser Untersuchungen wurden die Bestandteile der extrazellulären Matrix analysiert. Dazu zählten die Hyaluronsäure, die sulfatierten Glykosaminoglykane, Kollagen, Elastin und das Proteoglykan Biglycan. Zudem wurden exemplarisch Histologien angefertigt, die eine Übersicht über das Gewebe geben (HE-Färbung), die Verteilung und Clusterbildung der Hyaluronsäure (Alcianblau-PAS-Färbung) und Kalzifizierung des Präparats (*von-Kossa*-Färbung) darstellen sollten. Des Weiteren wurde eine größere Patientenpopulation auf die oben genannten Bestandteile der extrazellulären

Matrix untersucht. Es wurde darauf geachtet, eine ähnliche Verteilung der Parameter Geschlecht, Alter, Raucherstatus, Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie, koronarer Herzkrankheit und dem Durchmesser der *Aorta ascendens* zu gewährleisten.

Ergebnisse: Die Untersuchung der EZM-Bestandteile und die BAV-Patienten ließen sich anhand des Elastizitätsmoduls in zwei Untergruppen aufteilen. Dabei zeigte die BAV-Subgruppe (BAV-2) signifikant erhöhte Elastizitätsmodule der konvexen Seiten gegenüber der BAV-1-Gruppe ($p < 0,001$) und gegenüber der TAV-Gruppe ($p < 0,001$). Des Weiteren zeigte sich eine 1,1- bis 1,4-fach erhöhte Konzentration von Kollagen in der BAV-Subgruppe (BAV-2) gegenüber der BAV-1-Gruppe (K: $p = 0,148$; V: $p = 0,442$) und gegenüber der TAV-Gruppe (K: $p = 0,054$; V: $p = 0,255$). In der größeren Patientenpopulation konnte eine signifikant erhöhte Kollagenkonzentration in den konvexen Seiten der BAV- gegenüber der TAV-Gruppe ($p = 0,032$) aufgezeigt werden.

Nach Unterteilung der BAV- und TAV-Gruppe anhand des Aortendurchmessers (Trenngröße: 55 mm) konnten keine signifikanten Unterschiede im Elastizitätsmodul aufgezeigt werden. Jedoch war die Hyaluronsäure, als wesentlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix, in der BAV-Gruppe mit Durchmessern ≥ 55 Millimetern signifikant erhöht, verglichen mit den BAV-Patienten mit Durchmessern < 55 Millimetern ($p = 0,039$) und auch gegenüber der TAV-Gruppe mit Durchmessern ≥ 55 Millimetern ($p = 0,009$).

Die Analyse der Aortenwanddicke zeigte sowohl in der konvexen als auch der konkaven Seite der BAV-Gruppe eine signifikant dünnere *Tunica intima*, verglichen mit der TAV-Gruppe (K: $p < 0,001$; V: $p = 0,001$). In beiden Patientengruppen war die Mediadicke der konkaven gegenüber den konvexen Seiten signifikant erhöht (BAV: $p < 0,001$; TAV: $p = 0,001$). Dies spiegelt sich auch in der Gesamtdicke hinsichtlich des Verhältnisses der konvexen zu den konkaven Seiten bei der BAV-Gruppe ($p < 0,001$) und TAV-Gruppe ($p = 0,005$) wider. Weiterhin konnte eine signifikant verminderte Gesamtdicke der konvexen Seiten der BAV- gegenüber der TAV-Gruppe ($p = 0,018$) beobachtet werden.

Zudem gelang der Nachweis von einer signifikant erhöhten Kalzifizierung der konkaven und konvexen Seiten der BAV- gegenüber der TAV-Gruppe

(K: $p = 0,001$; V: $p < 0,001$). Beim Vergleich innerhalb der Gruppen war eine signifikante Erhöhung der Kalzifizierung bei den konvexen gegenüber den konkaven Seiten der BAV-Gruppe erkennbar ($p = 0,003$).

Diskussion: Das signifikant erhöhte Elastizitätsmodul der BAV-Subgruppe (BAV-2) und die damit verbundene erhöhte Steifigkeit des Aortengewebes ist möglicherweise auf die erhöhten Konzentrationen von Kollagen zurückzuführen (Azadani *et al.* 2012; Kobielarz *et al.* 2015; Ferrara *et al.* 2018). Da insbesondere die BAV-Gruppe signifikant erhöhte Elastizitätsmodule und erhöhte Kollagenkonzentrationen aufzeigte, könnte das Kollagen über die erhöhte Steifigkeit eine spezifische Rolle in der Pathogenese der Aneurysmenbildung und Aortendissektion bei Anlage einer bikuspiden Aortenklappe spielen (Babu *et al.* 2015). Die Elastizitätsmodule der nicht gerissenen Aortenproben unterstützen diesen Ansatz, da sie durchschnittlich geringere Mittelwerte als die BAV-Subgruppe (BAV-2) aufzeigten. Daraus könnte geschlussfolgert werden, dass ein Missverhältnis der steifen und elastischen Anteile der Aorta die Reißanfälligkeit des Gewebes erhöhen könnte.

Die in dieser Arbeit nachgewiesenen signifikant erhöhten Kalzifizierungen der BAV-Präparate könnten dahingehend eine weitere Erklärung der erhöhten Steifigkeit der BAV-Gruppe liefern (Mohr und Görz 2001; Kwon *et al.* 2011; Kurugol *et al.* 2015; Haunschild *et al.* 2017). Folglich könnte auch der vermehrte Kalzifizierungsgrad der BAV-Proben zur erhöhten Steifigkeit und dem damit verbundenen erhöhten Risiko der Aortendissektion beitragen (Babu *et al.* 2015).

Zusätzlich zu den hier vorgestellten Ergebnissen liefert auch die Hyaluronsäurekonzentration sowie ihre Zusammenlagerung in der *Tunica media* weitere Hinweise auf die Steifigkeit und Reißanfälligkeit des Aortengewebes. So ist eine Akkumulation der Hyaluronsäure im arteriellen Gefäß möglicherweise mit einer erhöhten Steifigkeit assoziiert (Lorentzen *et al.* 2016). In diesem Zusammenhang konnten in dieser Arbeit signifikant erhöhte Hyaluronsäurekonzentrationen bei der BAV-Gruppe mit Durchmessern ≥ 55 Millimetern gegenüber der entsprechenden TAV-Gruppe mit Durchmessern ≥ 55 Millimetern und der BAV-Gruppe mit Durchmessern < 55 Millimetern nachgewiesen werden. Die Akkumulation der Hyaluronsäure erhöht potenziell

durch ihre wasserbindenden Eigenschaften (Roccabianca *et al.* 2014a) die Reißanfälligkeit des Gewebes. Vor dem Hintergrund eines erhöhten Risikos der Aortendissektion bei zunehmenden Aortendurchmessern (Elefteriades 2010) könnte die Akkumulation und Konzentrationszunahme der Hyaluronsäure einen bedeutenden Risikofaktor oder eine mögliche Ursache der BAV-assoziierten Aortendissektion darstellen.

Schlussfolgerung: In dieser Arbeit konnte eine erhöhte Steifigkeit der Aortenproben der BAV-Gruppe nachgewiesen werden. Die erhöhte Steifigkeit ist dabei wahrscheinlich auf die BAV-spezifische Erhöhung der Kollagen- und Hyaluronsäurekonzentration sowie des Kalzifizierungsgrades zurückzuführen. Bei der Annahme eines erhöhten Risikos der Aortendissektion bei einem Missverhältnis von steifen und elastischen Anteilen in der Aortenwand ist davon auszugehen, dass die BAV-assoziierte Aortendissektion vorwiegend auf die erhöhte Steifigkeit des Gewebes zurückzuführen sein könnte.

Weiterhin konnte eine Zunahme der Hyaluronsäurekonzentration bei erhöhten Durchmessern der *Aorta ascendens* bei BAV-Patienten beobachtet werden. Damit könnte ein begünstigender oder kausaler Faktor der Aortendissektion bei BAV-Patienten nachgewiesen worden sein, der eine individuelle Risikoabschätzung bezüglich der Aortendissektion ermöglichen könnte.

8 Literaturverzeichnis

Akhtar, R.; Cruickshank, J. K.; Zhao, X.; Walton, L. A.; Gardiner, N. J.; Barrett, S. D. et al. (2014): Localized micro- and nano-scale remodelling in the diabetic aorta. In: *Acta biomaterialia* 10 (11), S. 4843–4851. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.07.001.

Antov, G. (1975): Vuzrastovi promeni v sudurzhanieto i kharakteristikata na glikozaminglikanite v choveshki aorti. In: *Eksperimentalna meditsina i morfologija* 14 (3), S. 151–155.

Aumüller, Gerhard; Wurzinger, Laurenz J. (2010): Anatomie. 208 Tabellen. 2. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1055/b-002-46981>.

Aydin, Ali; Desai, Nikolaus; Bernhardt, Alexander M. J.; Treede, Hendrik; Detter, Christian; Sheikhzadeh, Sara et al. (2013): Ascending aortic aneurysm and aortic valve dysfunction in bicuspid aortic valve disease. In: *International journal of cardiology* 164 (3), S. 301–305. DOI: 10.1016/j.ijcard.2011.07.018.

Azadani, Ali N.; Chitsaz, Sam; Matthews, Peter B.; Jaussaud, Nicolas; Leung, James; Tsinman, Tonia et al. (2012): Comparison of mechanical properties of human ascending aorta and aortic sinuses. In: *The Annals of thoracic surgery* 93 (1), S. 87–94. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2011.08.002.

Babu, Anju R.; Byju, Achu G.; Gundiah, Namrata (2015): Biomechanical Properties of Human Ascending Thoracic Aortic Dissections. In: *Journal of biomechanical engineering* 137 (8), S. 81013. DOI: 10.1115/1.4030752.

Barker, Alex J.; Markl, Michael; Bürk, Jonas; Lorenz, Ramona; Bock, Jelena; Bauer, Simon et al. (2012): Bicuspid aortic valve is associated with altered wall shear stress in the ascending aorta. In: *Circulation. Cardiovascular imaging* 5 (4), S. 457–466. DOI: 10.1161/CIRCIMAGING.112.973370.

Benedik, Jaroslav; Dohle, Daniel S.; Wendt, Daniel; Pilarczyk, Kevin; Price, Vivien; Mourad, Fanar et al. (2014): Comparison of ascending aortic cohesion between patients with bicuspid aortic valve stenosis and regurgitation. In: *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European*

Association for Cardio-thoracic Surgery 46 (6), e89-93. DOI: 10.1093/ejcts/ezu358.

Bentall, H.; Bono, A. de (1968): A technique for complete replacement of the ascending aorta. In: *Thorax* 23 (4), S. 338–339.

Bonow, Robert O.; Carabello, Blase A.; Chatterjee, Kanu; Leon, Antonio C. de; Faxon, David P.; Freed, Michael D. et al. (2008): 2008 Focused update incorporated into the ACC/AHA 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 1998 Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease): endorsed by the Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons. In: *Circulation* 118 (15), e523-661. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.190748.

Brodeur, Mathieu R.; Bouvet, Céline; Bouchard, Sonia; Moreau, Simon; Leblond, Jeanne; Deblois, Denis; Moreau, Pierre (2014): Reduction of advanced-glycation end products levels and inhibition of RAGE signaling decreases rat vascular calcification induced by diabetes. In: *PloS one* 9 (1), e85922. DOI: 10.1371/journal.pone.0085922.

Calloway, Troy J.; Martin, Lisa J.; Zhang, Xue; Tandon, Animesh; Benson, D. Woodrow; Hinton, Robert B. (2011): Risk factors for aortic valve disease in bicuspid aortic valve: a family-based study. In: *American journal of medical genetics. Part A* 155A (5), S. 1015–1020. DOI: 10.1002/ajmg.a.33974.

Cao, Kai; Atkins, Samantha K.; McNally, Andrew; Liu, Janet; Sucosky, Philippe (2017): Simulations of morphotype-dependent hemodynamics in non-dilated bicuspid aortic valve aortas. In: *Journal of biomechanics* 50, S. 63–70. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2016.11.024.

Cecconi, Moreno; Manfrin, Marcello; Moraca, Alessandra; Zanolli, Raffaele; Colonna, Pier Luigi; Bettuzzi, Maria Grazia et al. (2005): Aortic dimensions in patients with bicuspid aortic valve without significant valve dysfunction. In: *The American journal of cardiology* 95 (2), S. 292–294. DOI: 10.1016/j.amjcard.2004.08.098.

Chajara, A.; Delpech, B.; Courel, M. N.; Leroy, M.; Basuyau, J. P.; Lévesque, H. (1998): Effect of aging on neointima formation and hyaluronan, hyaluronidase and hyaluronectin production in injured rat aorta. In: *Atherosclerosis* 138 (1), S. 53–64.

Chan, K. L.; Stinson, W. A.; Veinot, J. P. (1999): Reliability of transthoracic echocardiography in the assessment of aortic valve morphology: pathological correlation in 178 patients. In: *The Canadian journal of cardiology* 15 (1), S. 48–52.

Cheheltani, Rabee; McGoverin, Cushla M.; Rao, Jayashree; Vorp, David A.; Kiani, Mohammad F.; Pleshko, Nancy (2014): Fourier transform infrared spectroscopy to quantify collagen and elastin in an in vitro model of extracellular matrix degradation in aorta. In: *The Analyst* 139 (12), S. 3039–3047. DOI: 10.1039/c3an02371k.

Chintapalli, Ravi Kiran; Breton, Stephanie; Dastjerdi, Ahmad Khayer; Barthelat, Francois (2014): Strain rate hardening. A hidden but critical mechanism for biological composites? In: *Acta biomaterialia* 10 (12), S. 5064–5073. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.08.027.

Choudhury, Nusrat; Bouchot, Olivier; Rouleau, Leonie; Tremblay, Dominique; Cartier, Raymond; Butany, Jagdish et al. (2009): Local mechanical and structural properties of healthy and diseased human ascending aorta tissue. In: *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 18 (2), S. 83–91. DOI: 10.1016/j.carpath.2008.01.001.

Chung, Ada W. Y.; Yang, H. H. Clarice; Radomski, Marek W.; van Breemen, Cornelis (2008): Long-term doxycycline is more effective than atenolol to prevent thoracic aortic aneurysm in marfan syndrome through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9. In: *Circulation research* 102 (8), e73-85. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.174367.

Cripe, Linda; Andelfinger, Gregor; Martin, Lisa J.; Shooner, Kerry; Benson, D. Woodrow (2004): Bicuspid aortic valve is heritable. In: *Journal of the American College of Cardiology* 44 (1), S. 138–143. DOI: 10.1016/j.jacc.2004.03.050.

Davis, Frances M.; Vita, Raffaella de (2012): A nonlinear constitutive model for stress relaxation in ligaments and tendons. In: *Annals of biomedical engineering* 40 (12), S. 2541–2550. DOI: 10.1007/s10439-012-0596-2.

Della Corte, Alessandro; Bancone, Ciro; Quarto, Cesare; Dialetto, Giovanni; Covino, Franco E.; Scardone, Michelangelo et al. (2007): Predictors of ascending aortic dilatation with bicuspid aortic valve. A wide spectrum of disease expression. In: *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 31 (3), 397-404; discussion 404-5. DOI: 10.1016/j.ejcts.2006.12.006.

Didangelos, Athanasios; Yin, Xiaoke; Mandal, Kaushik; Baumert, Mark; Jahangiri, Marjan; Mayr, Manuel (2010): Proteomics characterization of extracellular space components in the human aorta. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 9 (9), S. 2048–2062. DOI: 10.1074/mcp.M110.001693.

Dobrin, P. B.; Mrkvicka, R. (1994): Failure of elastin or collagen as possible critical connective tissue alterations underlying aneurysmal dilatation. In: *Cardiovascular surgery (London, England)* 2 (4), S. 484–488.

Dollery, C. M.; McEwan, J. R.; Henney, A. M. (1995): Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. In: *Circulation research* 77 (5), S. 863–868.

Dormand, Helen; Mohiaddin, Raad H. (2013): Cardiovascular magnetic resonance in Marfan syndrome. In: *Journal of cardiovascular magnetic resonance : official journal of the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance* 15, S. 33. DOI: 10.1186/1532-429X-15-33.

Elefteriades, John A. (2010): Indications for aortic replacement. In: *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 140 (6 Suppl), S5-9; discussion S45-51. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2010.10.001.

El-Hamamsy, Ismail; Yacoub, Magdi H. (2009): Cellular and molecular mechanisms of thoracic aortic aneurysms. In: *Nature reviews. Cardiology* 6 (12), S. 771–786. DOI: 10.1038/nrcardio.2009.191.

Erbel, Raimund; Aboyans, Victor; Boileau, Catherine; Bossone, Eduardo; Di Bartolomeo, Roberto; Eggebrecht, Holger et al. (2014): 2014 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of aortic diseases. Document covering acute and

chronic aortic diseases of the thoracic and abdominal aorta of the adult. The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Aortic Diseases of the European Society of Cardiology (ESC). In: *European heart journal* 35 (41), S. 2873–2926. DOI: 10.1093/eurheartj/ehu281.

Etz, Christian D.; Aspern, Konstantin von; Hoyer, Alexandro; Girrbaach, Felix F.; Leontyev, Sergey; Bakhtiary, Farhad et al. (2015): Acute type A aortic dissection. Characteristics and outcomes comparing patients with bicuspid versus tricuspid aortic valve. In: *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 48 (1), S. 142–150. DOI: 10.1093/ejcts/ezu388.

Etz, Christian D.; Misfeld, Martin; Borger, Michael A.; Luehr, Maximilian; Strottdrees, Elfriede; Mohr, Friedrich-Wilhelm (2012): Current indications for surgical repair in patients with bicuspid aortic valve and ascending aortic ectasia. In: *Cardiology research and practice* 2012, S. 313879. DOI: 10.1155/2012/313879.

Faber, M.; Møller-Hou, G. (1952): The human aorta. V. Collagen and elastin in the normal and hypertensive aorta. In: *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica* 31 (3), S. 377–382.

Fedak, Paul W. M.; Sa, Mauro P. L. de; Verma, Subodh; Nili, Nafiseh; Kazemian, Pedram; Butany, Jagdish et al. (2003): Vascular matrix remodeling in patients with bicuspid aortic valve malformations. Implications for aortic dilatation. In: *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 126 (3), S. 797–806.

Fedak, Paul W. M.; Verma, Subodh; David, Tirone E.; Leask, Richard L.; Weisel, Richard D.; Butany, Jagdish (2002): Clinical and pathophysiological implications of a bicuspid aortic valve. In: *Circulation* 106 (8), S. 900–904.

Ferrara, Anna; Totaro, Pasquale; Morganti, Simone; Auricchio, Ferdinando (2018): Effects of clinico-pathological risk factors on in-vitro mechanical properties of human dilated ascending aorta. In: *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 77, S. 1–11. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2017.08.032.

Forsell, Caroline; Björck, Hanna M.; Eriksson, Per; Franco-Cereceda, Anders; Gasser, T. Christian (2014): Biomechanical properties of the thoracic aneurysmal

wall. Differences between bicuspid aortic valve and tricuspid aortic valve patients. In: *The Annals of thoracic surgery* 98 (1), S. 65–71. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2014.04.042.

Gao, Yuan Z.; Saphirstein, Robert J.; Yamin, Rina; Suki, Bela; Morgan, Kathleen G. (2014): Aging impairs smooth muscle-mediated regulation of aortic stiffness. A defect in shock absorption function? In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 307 (8), H1252-61. DOI: 10.1152/ajpheart.00392.2014.

Garg, Vidu; Muth, Alecia N.; Ransom, Joshua F.; Schluterman, Marie K.; Barnes, Robert; King, Isabelle N. et al. (2005): Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. In: *Nature* 437 (7056), S. 270–274. DOI: 10.1038/nature03940.

Gasser, T. Christian; Ogden, Ray W.; Holzapfel, Gerhard A. (2006): Hyperelastic modelling of arterial layers with distributed collagen fibre orientations. In: *Journal of the Royal Society, Interface* 3 (6), S. 15–35. DOI: 10.1098/rsif.2005.0073.

Greenwald, S. E. (2007): Ageing of the conduit arteries. In: *The Journal of pathology* 211 (2), S. 157–172. DOI: 10.1002/path.2101.

Grewal, Nimrat; Gittenberger-de Groot, Adriana C.; Poelmann, Robert E.; Klautz, Robert J. M.; Lindeman, Johannes H. N.; Goumans, Marie-José et al. (2014): Ascending aorta dilation in association with bicuspid aortic valve. A maturation defect of the aortic wall. In: *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 148 (4), S. 1583–1590. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2014.01.027.

Gundiah, Namrata; Matthews, Peter B.; Karimi, Reza; Azadani, Ali; Guccione, Julius; Guy, T. Sloane et al. (2008): Significant material property differences between the porcine ascending aorta and aortic sinuses. In: *The Journal of heart valve disease* 17 (6), S. 606–613.

Guntheroth, Warren G. (2008): A critical review of the American College of Cardiology/American Heart Association practice guidelines on bicuspid aortic valve with dilated ascending aorta. In: *The American journal of cardiology* 102 (1), S. 107–110. DOI: 10.1016/j.amjcard.2008.02.106.

Gutierrez, P. S.; Reis, M. M.; Higuchi, M. L.; Aiello, V. D.; Stolf, N. A.; Lopes, E. A. (1998): Distribution of hyaluronan and dermatan/chondroitin sulfate

proteoglycans in human aortic dissection. In: *Connective tissue research* 37 (3-4), S. 151–161.

Hagan, P. G.; Nienaber, C. A.; Isselbacher, E. M.; Bruckman, D.; Karavite, D. J.; Russman, P. L. et al. (2000): The International Registry of Acute Aortic Dissection (IRAD). New insights into an old disease. In: *JAMA* 283 (7), S. 897–903.

Halper, Jaroslava; Kjaer, Michael (2014): Basic components of connective tissues and extracellular matrix. Elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. In: *Advances in experimental medicine and biology* 802, S. 31–47. DOI: 10.1007/978-94-007-7893-1_3.

Haunschild, Josephina; Schellinger, Isabel N.; Salisch, Sandy von; Bakhtiary, Farhad; Misfeld, Martin; Mohr, Friedrich Wilhelm et al. (2017): Granular Media Calcinosi in the Aortic Walls of Patients With Bicuspid and Tricuspid Aortic Valves. In: *The Annals of thoracic surgery* 103 (4), S. 1178–1185. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2016.07.018.

Heegaard, Anne-Marie; Corsi, Alessandro; Danielsen, Carl Christian; Nielsen, Karina L.; Jorgensen, Henrik L.; Riminucci, Mara et al. (2007): Biglycan deficiency causes spontaneous aortic dissection and rupture in mice. In: *Circulation* 115 (21), S. 2731–2738. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.653980.

Heinrich, Peter C.; Müller, Matthias; Graeve, Lutz; Löffler, Georg (Hg.) (2014): Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9., vollst. überarb. Aufl. Berlin: Springer (Springer-Lehrbuch). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3>.

Henne-Bruns, Doris; Barth, Eberhard (2012): Chirurgie. 292 Tabellen. 4., aktualisierte Aufl. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1055/b-002-89583>.

Hoffman, Julien I. E.; Kaplan, Samuel (2002): The incidence of congenital heart disease. In: *Journal of the American College of Cardiology* 39 (12), S. 1890–1900.

Holmes, Kathryn W.; Lehmann, Christoph U.; Dalal, Darshan; Nasir, Khuram; Dietz, Harry C.; Ravekes, William J. et al. (2007): Progressive dilation of the

ascending aorta in children with isolated bicuspid aortic valve. In: *The American journal of cardiology* 99 (7), S. 978–983. DOI: 10.1016/j.amjcard.2006.10.065.

Holzapfel, Gerhard A.; Ogden, Ray W. (2010): Modelling the layer-specific three-dimensional residual stresses in arteries, with an application to the human aorta. In: *Journal of the Royal Society, Interface* 7 (46), S. 787–799. DOI: 10.1098/rsif.2009.0357.

Hope, Michael D.; Hope, Thomas A.; Meadows, Alison K.; Ordovas, Karen G.; Urbania, Thomas H.; Alley, Marcus T.; Higgins, Charles B. (2010): Bicuspid aortic valve: four-dimensional MR evaluation of ascending aortic systolic flow patterns. In: *Radiology* 255 (1), S. 53–61. DOI: 10.1148/radiol.09091437.

Huang, Fei Qiong; Le Tan, Ju (2014): Pattern of aortic dilatation in different bicuspid aortic valve phenotypes and its association with aortic valvular dysfunction and elasticity. In: *Heart, lung & circulation* 23 (1), S. 32–38. DOI: 10.1016/j.hlc.2013.05.644.

Huntington, K.; Hunter, A. G.; Chan, K. L. (1997): A prospective study to assess the frequency of familial clustering of congenital bicuspid aortic valve. In: *Journal of the American College of Cardiology* 30 (7), S. 1809–1812.

Jackson, Veronica; Petrini, Johan; Caidahl, Kenneth; Eriksson, Maria J.; Liska, Jan; Eriksson, Per; Franco-Cereceda, Anders (2011): Bicuspid aortic valve leaflet morphology in relation to aortic root morphology. A study of 300 patients undergoing open-heart surgery. In: *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 40 (3), e118-24. DOI: 10.1016/j.ejcts.2011.04.014.

Jackson, Veronica; Petrini, Johan; Eriksson, Maria J.; Caidahl, Kenneth; Eriksson, Per; Franco-Cereceda, Anders (2014): Aortic dimensions in relation to bicuspid and tricuspid aortic valve pathology. In: *The Journal of heart valve disease* 23 (4), S. 463–472.

JCS Joint Working Group (2013): Guidelines for diagnosis and treatment of aortic aneurysm and aortic dissection (JCS 2011). Digest version. In: *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 77 (3), S. 789–828.

- Keane, M. G.; Wiegers, S. E.; Plappert, T.; Pochettino, A.; Bavaria, J. E.; Sutton, M. G. (2000): Bicuspid aortic valves are associated with aortic dilatation out of proportion to coexistent valvular lesions. In: *Circulation* 102 (19 Suppl 3), III35-9.
- Kidher, Emaddin; Harling, Leanne; Nihoyannopoulos, Petros; Shenker, Natalie; Ashrafian, Hutan; Francis, Darrel P. et al. (2014): High aortic pulse wave velocity is associated with poor quality of life in surgical aortic valve stenosis patients. In: *Interactive cardiovascular and thoracic surgery* 19 (2), S. 189–197. DOI: 10.1093/icvts/ivu156.
- Kim, K. M. (1976): Calcification of matrix vesicles in human aortic valve and aortic media. In: *Federation proceedings* 35 (2), S. 156–162.
- Kobielarz, Magdalena; Chwiłkowska, Agnieszka; Turek, Artur; Maksymowicz, Krzysztof; Marciniak, Monika (2015): Influence of selective digestion of elastin and collagen on mechanical properties of human aortas. In: *Acta of bioengineering and biomechanics* 17 (2), S. 55–62.
- Kochová, P.; Kuncová, J.; Svíglerová, J.; Cimrman, R.; Miklíková, M.; Liška, V.; Tonar, Z. (2012): The contribution of vascular smooth muscle, elastin and collagen on the passive mechanics of porcine carotid arteries. In: *Physiological measurement* 33 (8), S. 1335–1351. DOI: 10.1088/0967-3334/33/8/1335.
- Kong, Chee Hoe; Lin, Xiao Yun; Woo, Chin Cheng; Wong, Hung Chew; Lee, Chuen Neng; Richards, A. Mark; Sorokin, Vitaly A. (2013): Characteristics of aortic wall extracellular matrix in patients with acute myocardial infarction. Tissue microarray detection of collagen I, collagen III and elastin levels. In: *Interactive cardiovascular and thoracic surgery* 16 (1), S. 11–15. DOI: 10.1093/icvts/ivs421.
- Kurugol, Sila; Come, Carolyn E.; Diaz, Alejandro A.; Ross, James C.; Kinney, Greg L.; Black-Shinn, Jennifer L. et al. (2015): Automated quantitative 3D analysis of aorta size, morphology, and mural calcification distributions. In: *Medical physics* 42 (9), S. 5467–5478. DOI: 10.1118/1.4924500.
- Kurz, S. D.; Falk, V.; Kempfert, J.; Gieb, M.; Ruschinski, T. M.; Kukucka, M. et al. (2017): Insight into the incidence of acute aortic dissection in the German region of Berlin and Brandenburg. In: *International journal of cardiology* 241, S. 326–329. DOI: 10.1016/j.ijcard.2017.05.024.

Kwon, Jee Eun; Mintz, Gary S.; Kim, Sang-Wook; Oh, Min Seok; Min, Yun Ju; Kim, Hyang Kyoung et al. (2011): Relationship between coronary artery plaque composition by virtual histology intravascular ultrasound analysis and brachial-ankle pulse wave velocity in patients with coronary artery disease. In: *Coronary artery disease* 22 (8), S. 565–569. DOI: 10.1097/MCA.0b013e32834c5e6f.

Larson, E. W.; Edwards, W. D. (1984): Risk factors for aortic dissection. A necropsy study of 161 cases. In: *The American journal of cardiology* 53 (6), S. 849–855.

Lee, Jiwon; Shen, Mengcheng; Parajuli, Nirmal; Oudit, Gavin Y.; McMurtry, Michael Sean; Kassiri, Zamaneh (2014): Gender-dependent aortic remodelling in patients with bicuspid aortic valve-associated thoracic aortic aneurysm. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 92 (9), S. 939–949. DOI: 10.1007/s00109-014-1178-6.

Lee, Mirae; Sung, Jidong; Cho, Soo Jin; Choi, Soo Hee; Cho, Sung Won; Oh, Jae K. et al. (2013): Aortic dilatation and calcification in asymptomatic patients with bicuspid aortic valve. Analysis in a Korean health screening population. In: *The international journal of cardiovascular imaging* 29 (3), S. 553–560. DOI: 10.1007/s10554-012-0116-3.

Lee, T. C.; Zhao, Y. D.; Courtman, D. W.; Stewart, D. J. (2000): Abnormal aortic valve development in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. In: *Circulation* 101 (20), S. 2345–2348.

Li, Zhaojun; Du, Lianfang; Wang, Feng; Luo, Xianghong (2016): Assessment of the arterial stiffness in patients with acute ischemic stroke using longitudinal elasticity modulus measurements obtained with Shear Wave Elastography. In: *Medical ultrasonography* 18 (2), S. 182–189. DOI: 10.11152/mu.2013.2066.182.wav.

Longobardo, Luca; Carerj, Maria Ludovica; Pizzino, Gabriele; Bitto, Alessandra; Piccione, Maurizio Cusma; Zucco, Marta et al. (2017): Impairment of elastic properties of the aorta in bicuspid aortic valve. Relationship between biomolecular and aortic strain patterns. In: *European heart journal cardiovascular Imaging*. DOI: 10.1093/ehjci/jex224.

Lorentzen, Karen Axelgaard; Chai, Song; Chen, Hui; Danielsen, Carl Christian; Simonsen, Ulf; Wogensen, Lise (2016): Mechanisms involved in extracellular matrix remodeling and arterial stiffness induced by hyaluronan accumulation. In: *Atherosclerosis* 244, S. 195–203. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.11.016.

Mahadevia, Riti; Barker, Alex J.; Schnell, Susanne; Entezari, Pegah; Kansal, Preeti; Fedak, Paul W. M. et al. (2014): Bicuspid aortic cusp fusion morphology alters aortic three-dimensional outflow patterns, wall shear stress, and expression of aortopathy. In: *Circulation* 129 (6), S. 673–682. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.003026.

Martin, Lisa J.; Ramachandran, Vijaya; Cripe, Linda H.; Hinton, Robert B.; Andelfinger, Gregor; Tabangin, Meredith et al. (2007): Evidence in favor of linkage to human chromosomal regions 18q, 5q and 13q for bicuspid aortic valve and associated cardiovascular malformations. In: *Human genetics* 121 (2), S. 275–284. DOI: 10.1007/s00439-006-0316-9.

Masri, Ahmad; Svensson, Lars G.; Griffin, Brian P.; Desai, Milind Y. (2017): Contemporary natural history of bicuspid aortic valve disease: a systematic review. In: *Heart (British Cardiac Society)* 103 (17), S. 1323–1330. DOI: 10.1136/heartjnl-2016-309916.

Mattson, Jeffrey M.; Turcotte, Raphaël; Zhang, Yanhang (2017): Glycosaminoglycans contribute to extracellular matrix fiber recruitment and arterial wall mechanics. In: *Biomechanics and modeling in mechanobiology* 16 (1), S. 213–225. DOI: 10.1007/s10237-016-0811-4.

McDonald, Thomas O.; Gerrity, Ross G.; Jen, Christy; Chen, Hao-Ji; Wark, Kathleen; Wight, Thomas N. et al. (2007): Diabetes and arterial extracellular matrix changes in a porcine model of atherosclerosis. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 55 (11), S. 1149–1157. DOI: 10.1369/jhc.7A7221.2007.

Michelena, Hector I.; Desjardins, Valerie A.; Avierinos, Jean-François; Russo, Antonio; Nkomo, Vuyisile T.; Sundt, Thoralf M. et al. (2008): Natural history of asymptomatic patients with normally functioning or minimally dysfunctional bicuspid aortic valve in the community. In: *Circulation* 117 (21), S. 2776–2784. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.740878.

- Miller, D. C.; Stinson, E. B.; Oyer, P. E.; Rossiter, S. J.; Reitz, B. A.; Griepp, R. B.; Shumway, N. E. (1979): Operative treatment of aortic dissections. Experience with 125 patients over a sixteen-year period. In: *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 78 (3), S. 365–382.
- Mills, P.; Leech, G.; Davies, M.; Leathan, A. (1978): The natural history of a non-stenotic bicuspid aortic valve. In: *British heart journal* 40 (9), S. 951–957.
- Mohamed, Salah A.; Aherrahrou, Zouhair; Liptau, Henrike; Erasmi, Armin W.; Hagemann, Carolin; Wrobel, Sandra et al. (2006): Novel missense mutations (p.T596M and p.P1797H) in NOTCH1 in patients with bicuspid aortic valve. In: *Biochemical and biophysical research communications* 345 (4), S. 1460–1465. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.05.046.
- Mohr, W.; Görz, E. (2001): Granuläre Mediakalzinose der Aorta. Strukturelle Befunde, historischer Rückblick und pathogenetische Bedeutung. In: *Zeitschrift für Kardiologie* 90 (12), S. 916–928.
- Mordi, Ify; Tzemos, Nikolaos (2012): Bicuspid aortic valve disease: a comprehensive review. In: *Cardiology research and practice* 2012, S. 196037. DOI: 10.1155/2012/196037.
- Morgan-Hughes, Gareth J.; Roobottom, Carl A.; Owens, Patrick E.; Marshall, Andrew J. (2004): Dilatation of the aorta in pure, severe, bicuspid aortic valve stenosis. In: *American heart journal* 147 (4), S. 736–740. DOI: 10.1016/j.ahj.2003.10.044.
- Mosorin, M.; Juvonen, J.; Biancari, F.; Satta, J.; Surcel, H. M.; Leinonen, M. et al. (2001): Use of doxycycline to decrease the growth rate of abdominal aortic aneurysms. A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. In: *Journal of vascular surgery* 34 (4), S. 606–610. DOI: 10.1067/mva.2001.117891.
- Myers, V. C.; Lang, W. W. (1946): Some chemical changes in the human thoracic aorta accompanying the aging process. In: *Journal of gerontology* 1 (Pt 1 4), S. 441–444.
- Nathan, Derek P.; Xu, Chun; Plappert, Ted; Desjardins, Benoit; Gorman, Joseph H.; Bavaria, Joseph E. et al. (2011): Increased ascending aortic wall stress in

patients with bicuspid aortic valves. In: *The Annals of thoracic surgery* 92 (4), S. 1384–1389. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2011.04.118.

Nienaber, C. A.; Kodolitsch, Y. von (1992): Metaanalyse zur Prognose der thorakalen Aortendissektion. Letalität im Wandel der letzten vier Jahrzehnte. In: *Herz* 17 (6), S. 398–416.

Nishimura, Rick A.; Otto, Catherine M.; Bonow, Robert O.; Carabello, Blase A.; Erwin, John P.; Guyton, Robert A. et al. (2014): 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. In: *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 148 (1), e1-e132. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2014.05.014.

Nistri, S.; Sorbo, M. D.; Marin, M.; Palisi, M.; Scognamiglio, R.; Thiene, G. (1999): Aortic root dilatation in young men with normally functioning bicuspid aortic valves. In: *Heart (British Cardiac Society)* 82 (1), S. 19–22.

Niwa, K.; Perloff, J. K.; Bhuta, S. M.; Laks, H.; Drinkwater, D. C.; Child, J. S.; Miner, P. D. (2001): Structural abnormalities of great arterial walls in congenital heart disease. Light and electron microscopic analyses. In: *Circulation* 103 (3), S. 393–400.

Olivier, Jake; Johnson, William D.; Marshall, Gailen D. (2008): The logarithmic transformation and the geometric mean in reporting experimental IgE results. What are they and when and why to use them? In: *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 100 (4), S. 333–337. DOI: 10.1016/S1081-1206(10)60595-9.

Pachulski, R. T.; Weinberg, A. L.; Chan, K. L. (1991): Aortic aneurysm in patients with functionally normal or minimally stenotic bicuspid aortic valve. In: *The American journal of cardiology* 67 (8), S. 781–782.

Pan, Wenzhi; Li, Mingfei; Zhou, Daxin; Guan, Lihua; Cheng, Leilei; Ge, Junbo (2015): Prevalence and echocardiographic feature of bicuspid aortic valve in patients with severe aortic stenosis. A echocardiography database analysis. In: *Zhonghua xin xue guan bing za zhi* 43 (3), S. 244–247.

- Pees, Christiane; Michel-Behnke, Ina (2012): Morphology of the bicuspid aortic valve and elasticity of the adjacent aorta in children. In: *The American journal of cardiology* 110 (9), S. 1354–1360. DOI: 10.1016/j.amjcard.2012.06.043.
- Peña, Juan A.; Martínez, Miguel A.; Peña, Estefanía (2015): Layer-specific residual deformations and uniaxial and biaxial mechanical properties of thoracic porcine aorta. In: *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 50, S. 55–69. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2015.05.024.
- Pethig, K.; Harringer, W.; Haverich, A. (1998): Aortenklappeninsuffizienz bei Aneurysmen der Aorta ascendens. Funktionelle Ergebnisse nach klappenerhaltender Rekonstruktion. In: *Deutsche medizinische Wochenschrift* (1946) 123 (43), S. 1263–1268. DOI: 10.1055/s-2007-1024166.
- Pham, T.; Martin, C.; Elefteriades, J.; Sun, W. (2013): Biomechanical characterization of ascending aortic aneurysm with concomitant bicuspid aortic valve and bovine aortic arch. In: *Acta biomaterialia* 9 (8), S. 7927–7936. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.04.021.
- Phillippi, Julie A.; Green, Benjamin R.; Eskay, Michael A.; Kotlarczyk, Mary P.; Hill, Michael R.; Robertson, Anne M. et al. (2014): Mechanism of aortic medial matrix remodeling is distinct in patients with bicuspid aortic valve. In: *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 147 (3), S. 1056–1064. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2013.04.028.
- Pichamuthu, Joseph E.; Phillippi, Julie A.; Cleary, Deborah A.; Chew, Douglas W.; Hempel, John; Vorp, David A.; Gleason, Thomas G. (2013): Differential tensile strength and collagen composition in ascending aortic aneurysms by aortic valve phenotype. In: *The Annals of thoracic surgery* 96 (6), S. 2147–2154. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2013.07.001.
- Rayner, J.; Coffey, S.; Newton, J.; Prendergast, B. D. (2014): Aortic valve disease. In: *International journal of clinical practice* 68 (10), S. 1209–1215. DOI: 10.1111/ijcp.12471.
- Roberts, W. C. (1970): The congenitally bicuspid aortic valve. A study of 85 autopsy cases. In: *The American journal of cardiology* 26 (1), S. 72–83.

Robicsek, Francis; Thubrikar, Mano J.; Cook, Joseph W.; Fowler, Brett (2004): The congenitally bicuspid aortic valve: how does it function? Why does it fail? In: *The Annals of thoracic surgery* 77 (1), S. 177–185.

Roccabianca, S.; Bellini, C.; Humphrey, J. D. (2014a): Computational modelling suggests good, bad and ugly roles of glycosaminoglycans in arterial wall mechanics and mechanobiology. In: *Journal of the Royal Society, Interface* 11 (97), S. 20140397. DOI: 10.1098/rsif.2014.0397.

Roccabianca, Sara; Ateshian, Gerard A.; Humphrey, Jay D. (2014b): Biomechanical roles of medial pooling of glycosaminoglycans in thoracic aortic dissection. In: *Biomechanics and modeling in mechanobiology* 13 (1), S. 13–25. DOI: 10.1007/s10237-013-0482-3.

Russo, Claudio F.; Mazzetti, Simone; Garatti, Andrea; Ribera, Elena; Milazzo, Angela; Bruschi, Giuseppe et al. (2002): Aortic complications after bicuspid aortic valve replacement: long-term results. In: *The Annals of thoracic surgery* 74 (5), S1773-6; discussion S1792-9.

Saikrishnan, Neelakantan; Mirabella, Lucia; Yoganathan, Ajit P. (2015): Bicuspid aortic valves are associated with increased wall and turbulence shear stress levels compared to trileaflet aortic valves. In: *Biomechanics and modeling in mechanobiology* 14 (3), S. 577–588. DOI: 10.1007/s10237-014-0623-3.

Samila, Z. J.; Carter, S. A. (1981): The effect of age on the unfolding of elastin lamellae and collagen fibers with stretch in human carotid arteries. In: *Canadian journal of physiology and pharmacology* 59 (10), S. 1050–1057.

Sans, M.; Moragas, A. (1993): Mathematical morphologic analysis of the aortic medial structure. Biomechanical implications. In: *Analytical and quantitative cytology and histology* 15 (2), S. 93–100.

Santarpia, Giuseppe; Scognamiglio, Giancarlo; Di Salvo, Giovanni; D'Alto, Michele; Sarubbi, Berardo; Romeo, Emanuele et al. (2012): Aortic and left ventricular remodeling in patients with bicuspid aortic valve without significant valvular dysfunction. A prospective study. In: *International journal of cardiology* 158 (3), S. 347–352. DOI: 10.1016/j.ijcard.2011.01.046.

- Schlatmann, T. J.; Becker, A. E. (1977): Histologic changes in the normal aging aorta. Implications for dissecting aortic aneurysm. In: *The American journal of cardiology* 39 (1), S. 13–20.
- Segreto, Antonio; Chiusaroli, Alessandro; Salvatore, Sergio de; Bizzarri, Federico (2014): Biomarkers for the diagnosis of aortic dissection. In: *Journal of cardiac surgery* 29 (4), S. 507–511. DOI: 10.1111/jocs.12358.
- Sievers, Hans-H; Schmidtke, Claudia (2007): A classification system for the bicuspid aortic valve from 304 surgical specimens. In: *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 133 (5), S. 1226–1233. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2007.01.039.
- Silver, F. H.; Horvath, I.; Foran, D. J. (2001): Viscoelasticity of the vessel wall. The role of collagen and elastic fibers. In: *Critical reviews in biomedical engineering* 29 (3), S. 279–301.
- Siu, Samuel C.; Silversides, Candice K. (2010): Bicuspid aortic valve disease. In: *Journal of the American College of Cardiology* 55 (25), S. 2789–2800. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.12.068.
- Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D. et al. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. In: *Analytical biochemistry* 150 (1), S. 76–85.
- Sokolis, Dimitrios P.; Kritharis, Eleftherios P.; Giagini, Athina T.; Lampropoulos, Konstantinos M.; Papadodima, Stavroula A.; Iliopoulos, Dimitrios C. (2012): Biomechanical response of ascending thoracic aortic aneurysms. Association with structural remodelling. In: *Computer methods in biomechanics and biomedical engineering* 15 (3), S. 231–248. DOI: 10.1080/10255842.2010.522186.
- Statistisches Bundesamt, Wiesbaden 2015: Bevölkerung und Erwerbstätigkeit; Ausgangsdaten der Bevölkerungsfortschreibung aus dem Zensus 2011
- Stewart, A. B.; Ahmed, R.; Travill, C. M.; Newman, C. G. (1993): Coarctation of the aorta life and health 20-44 years after surgical repair. In: *British heart journal* 69 (1), S. 65–70.

Stock, Sina; Mohamed, Salah A.; Sievers, Hans-Hinrich (2017): Bicuspid aortic valve related aortopathy. In: *General thoracic and cardiovascular surgery*. DOI: 10.1007/s11748-017-0821-x.

Taghizadeh, Hadi; Tafazzoli-Shadpour, Mohammad; Shadmehr, Mohammad B. (2015): Analysis of arterial wall remodeling in hypertension based on lamellar modeling. In: *Journal of the American Society of Hypertension : JASH* 9 (9), S. 735–744. DOI: 10.1016/j.jash.2015.07.014.

Tamarina, N. A.; Grassi, M. A.; Johnson, D. A.; Pearce, W. H. (1998): Proteoglycan gene expression is decreased in abdominal aortic aneurysms. In: *The Journal of surgical research* 74 (1), S. 76–80. DOI: 10.1006/jsre.1997.5201.

Tanaka, Ryoichi; Yoshioka, Kunihiro; Niinuma, Hiroyuki; Ohsawa, Satoshi; Okabayashi, Hitoshi; Ehara, Shigeru (2010): Diagnostic value of cardiac CT in the evaluation of bicuspid aortic stenosis: comparison with echocardiography and operative findings. In: *AJR. American journal of roentgenology* 195 (4), S. 895–899. DOI: 10.2214/AJR.09.3164.

Tang, Paul C. Y.; Coady, Michael A.; Lovoulos, Constantinos; Dardik, Alan; Aslan, Mihaela; Elefteriades, John A.; Tellides, George (2005): Hyperplastic cellular remodeling of the media in ascending thoracic aortic aneurysms. In: *Circulation* 112 (8), S. 1098–1105. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.511717.

Tang, Tao; Thompson, Joel C.; Wilson, Patricia G.; Yoder, Meghan H.; Müller, Julia; Fischer, Jens W. et al. (2014): Biglycan deficiency. Increased aortic aneurysm formation and lack of atheroprotection. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 75, S. 174–180. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.07.014.

Tanimura, A.; McGregor, D. H.; Anderson, H. C. (1986): Calcification in atherosclerosis. I. Human studies. In: *Journal of experimental pathology* 2 (4), S. 261–273.

Thanassoulis, George; Yip, James W. L.; Filion, Kris; Jamorski, Michal; Webb, Gary; Siu, Samuel C.; Therrien, Judith (2008): Retrospective study to identify predictors of the presence and rapid progression of aortic dilatation in patients with bicuspid aortic valves. In: *Nature clinical practice. Cardiovascular medicine* 5 (12), S. 821–828. DOI: 10.1038/ncpcardio1369.

Theocharis, Achilleas D.; Karamanos, Nikos K. (2002): Decreased biglycan expression and differential decorin localization in human abdominal aortic aneurysms. In: *Atherosclerosis* 165 (2), S. 221–230.

Toda, T.; Tsuda, N.; Nishimori, I.; Leszczynski, D. E.; Kummerow, F. A. (1980): Morphometrical analysis of the aging process in human arteries and aorta. In: *Acta anatomica* 106 (1), S. 35–44.

Tousoulis, Dimitris; Kampoli, Anna-Maria; Papageorgiou, Nikolaos; Androulakis, Emmanuel; Antoniadis, Charalambos; Toutouzas, Konstantinos; Stefanadis, Christodoulos (2011): Pathophysiology of atherosclerosis. The role of inflammation. In: *Current pharmaceutical design* 17 (37), S. 4089–4110.

Tsamis, Alkiviadis; Krawiec, Jeffrey T.; Vorp, David A. (2013): Elastin and collagen fibre microstructure of the human aorta in ageing and disease. A review. In: *Journal of the Royal Society, Interface* 10 (83), S. 20121004. DOI: 10.1098/rsif.2012.1004.

Tunstall-Pedoe, Hugh (2003): MONICA. Monograph and multimedia sourcebook : world's largest study of heart disease, stroke, risk factors, and population trends, 1979-2002. Geneva: World Health Organization.

Tutar, Ercan; Ekici, Filiz; Atalay, Semra; Nacar, Nazire (2005): The prevalence of bicuspid aortic valve in newborns by echocardiographic screening. In: *American heart journal* 150 (3), S. 513–515. DOI: 10.1016/j.ahj.2004.10.036.

Tzemos, Nikolaos; Therrien, Judith; Yip, James; Thanassoulis, George; Tremblay, Sonia; Jamorski, Michal T. et al. (2008): Outcomes in adults with bicuspid aortic valves. In: *JAMA* 300 (11), S. 1317–1325. DOI: 10.1001/jama.300.11.1317.

Verma, Subodh; Siu, Samuel C. (2014): Aortic dilatation in patients with bicuspid aortic valve. In: *The New England journal of medicine* 370 (20), S. 1920–1929. DOI: 10.1056/NEJMra1207059.

Ward, C. (2000): Clinical significance of the bicuspid aortic valve. In: *Heart (British Cardiac Society)* 83 (1), S. 81–85.

Wei, Ching-Chuan (2011): An innovative method to measure the peripheral arterial elasticity. Spring constant modeling based on the arterial pressure wave

with radial vibration. In: *Annals of biomedical engineering* 39 (11), S. 2695–2705. DOI: 10.1007/s10439-011-0357-7.

Weissberg, P. (1999): Mechanisms modifying atherosclerotic disease - from lipids to vascular biology. In: *Atherosclerosis* 147 Suppl 1, S3-10.

Whittle, M. A.; Hasleton, P. S.; Anderson, J. C.; Gibbs, A. C. (1990): Collagen in dissecting aneurysms of the human thoracic aorta. Increased collagen content and decreased collagen concentration may be predisposing factors in dissecting aneurysms. In: *The American journal of cardiovascular pathology* 3 (4), S. 311–319.

Yamada, Hiroshi; Sakata, Noriyuki; Wada, Hideichi; Tashiro, Tadashi; Tayama, Eiki (2015): Age-related distensibility and histology of the ascending aorta in elderly patients with acute aortic dissection. In: *Journal of biomechanics* 48 (12), S. 3267–3273. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2015.06.025.

Ziemer, Gerhard; Haverich, Axel (2010): Herzchirurgie. Die Eingriffe am Herzen und den herznahen Gefäßen. 3., völlig neu bearbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10361981>.

Zulliger, Martin A.; Stergiopoulos, Nikos (2007): Structural strain energy function applied to the ageing of the human aorta. In: *Journal of biomechanics* 40 (14), S. 3061–3069. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2007.03.011.

Sämtliche Online-Ressourcen wurden im Zeitraum vom August 2017 bis Januar 2019 aufgerufen.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der BAV-Klappentypen	4
Abbildung 2: Aneurysma der Aorta ascendens	7
Abbildung 3: OP-Methoden nach David und Yacoub	12
Abbildung 4: Bei der OP entnommenes Aortengewebe	25
Abbildung 5: Auftrennung des Testmaterials	26
Abbildung 6: Tensile Stage mit Aortenprobe.....	27
Abbildung 7: Gestretchte Aorta	27
Abbildung 8: Gerissene Aorta	28
Abbildung 9: Darstellung der Elastizitätsmodule	51
Abbildung 10: Darstellung der Kollagenkonzentration	52
Abbildung 11: Darstellung der GAG-Konzentration.....	53
Abbildung 12: Darstellung der Elastizitätsmodule	56
Abbildung 13: Darstellung der Hyaluronsäurekonzentration	57
Abbildung 14: Darstellung der Kollagenkonzentration	58
Abbildung 15: Exemplarische Histologie einer gerissenen Aorta	60
Abbildung 16: Exemplarische Histologie einer nicht gerissenen Aorta	61
Abbildung 17: Darstellung der Dicke der Tunica intima.....	65
Abbildung 18: Darstellung der Media- und Gesamtdicke	66
Abbildung 19: HE-Färbung eines BAV- und TAV-Präparats	66
Abbildung 20: Darstellung der Hyaluronsäurekonzentration	67
Abbildung 21: Darstellung der GAG-Konzentration.....	68
Abbildung 22: Darstellung der Hyaluronsäure-Clusterbildung.....	69

Abbildung 23: Darstellung der Hyaluronsäure-Verteilung	70
Abbildung 24: Darstellung von Biglycan und GAPDH im Western Blot.....	70
Abbildung 25: Darstellung der Biglycanexpression	71
Abbildung 26: Darstellung der Elastinkonzentration.....	72
Abbildung 27: Darstellung der Kollagenkonzentration	73
Abbildung 28: Darstellung der Kalzifizierung.....	75
Abbildung 29: Von-Kossa-Färbung eines BAV- und TAV-Präparats.....	75

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels	35
Tabelle 2: Antikörper mit Verdünnung	37
Tabelle 3: Protokoll des Gewebeeinfiltrationsautomaten.....	38
Tabelle 4: Alcianblau-PAS-Färbung	42
Tabelle 5: Alcianblau-PAS-Färbung	43
Tabelle 6: Patientenpopulation der gestreckten Patientenproben.....	46
Tabelle 7: Unterschiede des Elastizitätsmoduls in den konvexen und konkaven Seiten.....	47
Tabelle 8: Zusammenfassung der nicht gerissenen Aortenproben	47
Tabelle 9: Patientenpopulation der nicht gerissenen Aortenproben	48
Tabelle 10: Patientenpopulation der BAV- und TAV-Gruppen nach Elastizitätsmodul sortiert.....	49
Tabelle 11: Zusammenfassung der Elastizitätsmodule der Untergruppen	50
Tabelle 12: Zusammenfassung der Kollagenbestimmung der Untergruppen...	51
Tabelle 13: Zusammenfassung der GAG-Bestimmung der Untergruppen	52
Tabelle 14: Patientenpopulation der BAV- und TAV-Gruppe nach Durch- messer sortiert.....	54
Tabelle 15: Zusammenfassung des Elastizitätsmoduls nach Aortendurch- messer sortiert.....	55
Tabelle 16: Zusammenfassung der Hyaluronsäurebestimmung nach Aorten- durchmesser sortiert.....	56
Tabelle 17: Zusammenfassung der Kollagenbestimmung nach Aortendurch- messer sortiert.....	57

Tabelle 18: Zusammenfassung der Biglycanbestimmung nach Aorten- durchmesser sortiert.....	58
Tabelle 19: Patientenpopulation der unabhängigen EZM-Untersuchung	63
Tabelle 20: Zusammenfassung der Wanddickenbestimmung.....	64
Tabelle 21: Zusammenfassung der Hyaluronsäurebestimmung	67
Tabelle 22: Zusammenfassung der GAG-Bestimmung.....	68
Tabelle 23: Zusammenfassung der Biglycanbestimmung	71
Tabelle 24: Zusammenfassung der Elastinbestimmung.....	72
Tabelle 25: Zusammenfassung der Kollagenbestimmung.....	73
Tabelle 26: Quantifizierung der Kalzifizierung	74

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Christian D. Etz für die Bereitstellung des Themas, der Labore im Sächsischen Inkubator für klinische Translation und der Möglichkeit des Verfassens der Dissertation im Fachgebiet Herzchirurgie bedanken.

Mein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Stefan Mayr für das Bereitstellen der Labore am Leibniz-Institut für Oberflächenmodifizierung e.V. Leipzig.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Josephina Haunschild für die exzellente Betreuung, ihre Anregungen und das Aufzeigen weiterer Perspektiven während des Entstehens dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, aber auch des gesamten Sächsischen Inkubators für klinische Translation bedanken. Hervorheben möchte ich dabei insbesondere Frau Kerstin Krist und Frau Sabrina Friebe für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Der größte Dank gilt meiner lieben Neda und meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, für die Unterstützung und Motivation während des Entstehens dieser Dissertation.

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

.....

Datum

.....

Unterschrift

Lebenslauf

Name: Cramer
Vorname: Clemens
Geburtsdatum: 26.02.1993
Geburtsort: Berlin

Ausbildung

2003 – 2011	Thomasschule zu Leipzig (Gymnasium)
2003 – 2011	Thomanerchor zu Leipzig
2012 – 2014	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Medizinstudium Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2014 – 2018	Universität Leipzig Medizinstudium Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Dezember 2019	Universität Leipzig Medizinstudium Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praxiserfahrungen

März 2015	Famulatur in der Hausärztlichen Versorgung Annette und Matthias Tritschler – Bremerhaven
Juli – August 2015	Famulatur in der Klinik für Innere Medizin/Kardiologie Prof. Dr. Gerhard Schuler – Herzzentrum Leipzig
Oktober 2015 – September 2018	Fahrer beim ärztlichen Bereitschaftsdienst der Kassenärztlichen Vereinigungen, ASB Leipzig

August – September 2016	Famulatur in der Hausärztlichen Versorgung/Innere Medizin Dr. med. Michael Geisler – Leipzig
Februar – März 2017	Famulatur in der Orthopädie/Unfallchirurgie Dr. Bernhard Scherger – Klinikum Emden
August 2017 – November 2019	Doktorand am Sächsischen Inkubator für klinische Translation Prof Dr. Christian D. Etz – Herzzentrum Leipzig
November 2018 – September 2019	Praktisches Jahr: 1. Terial: Innere Medizin, Robert Koch Klinik Leipzig 2. Terial: Dermatologie, Universitätsklinikum Leipzig 3. Terial: Hand- und Plastische Chirurgie, Orthopädie und Unfallchirurgie, Kantonsspital Frauenfeld (Schweiz)